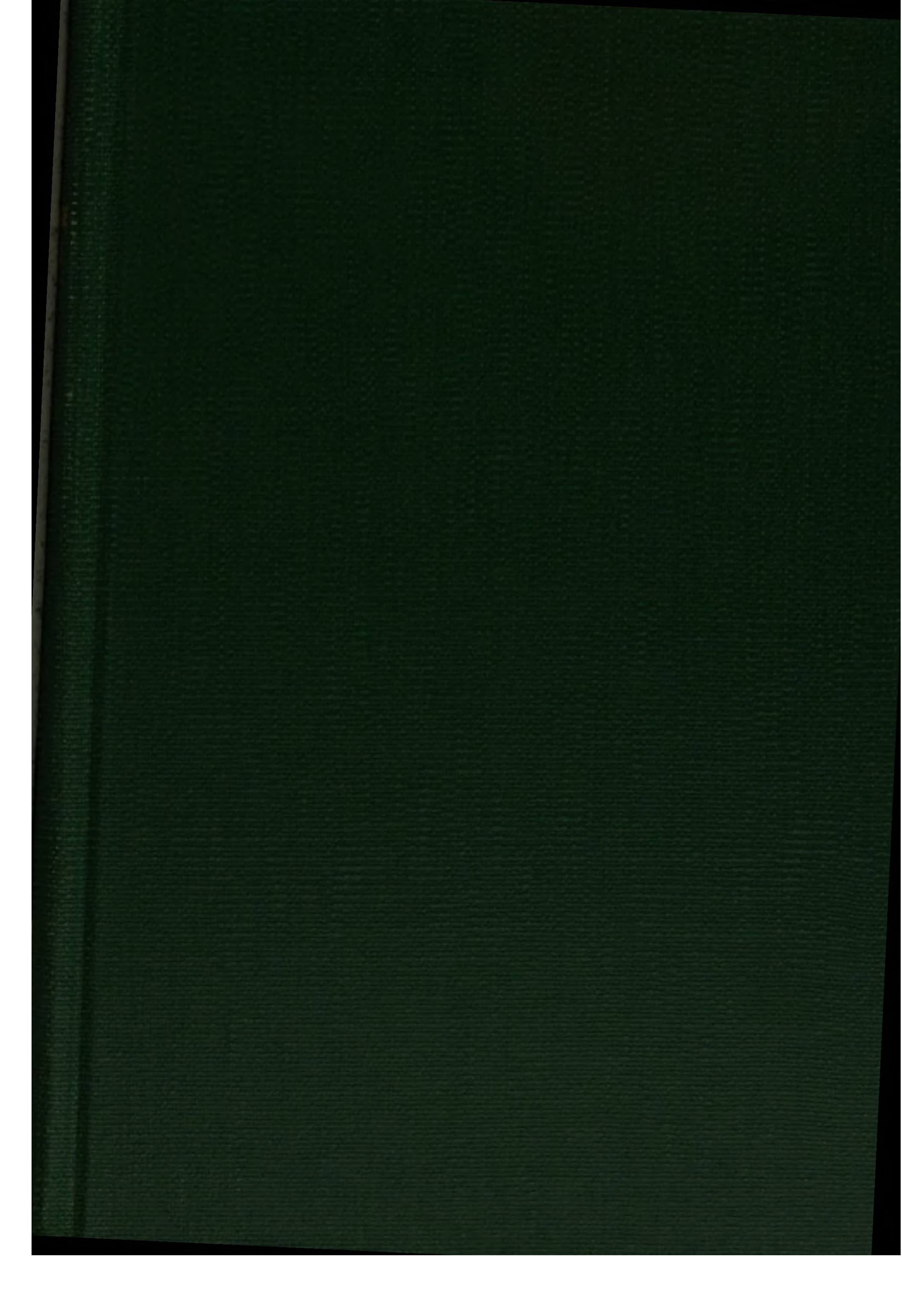
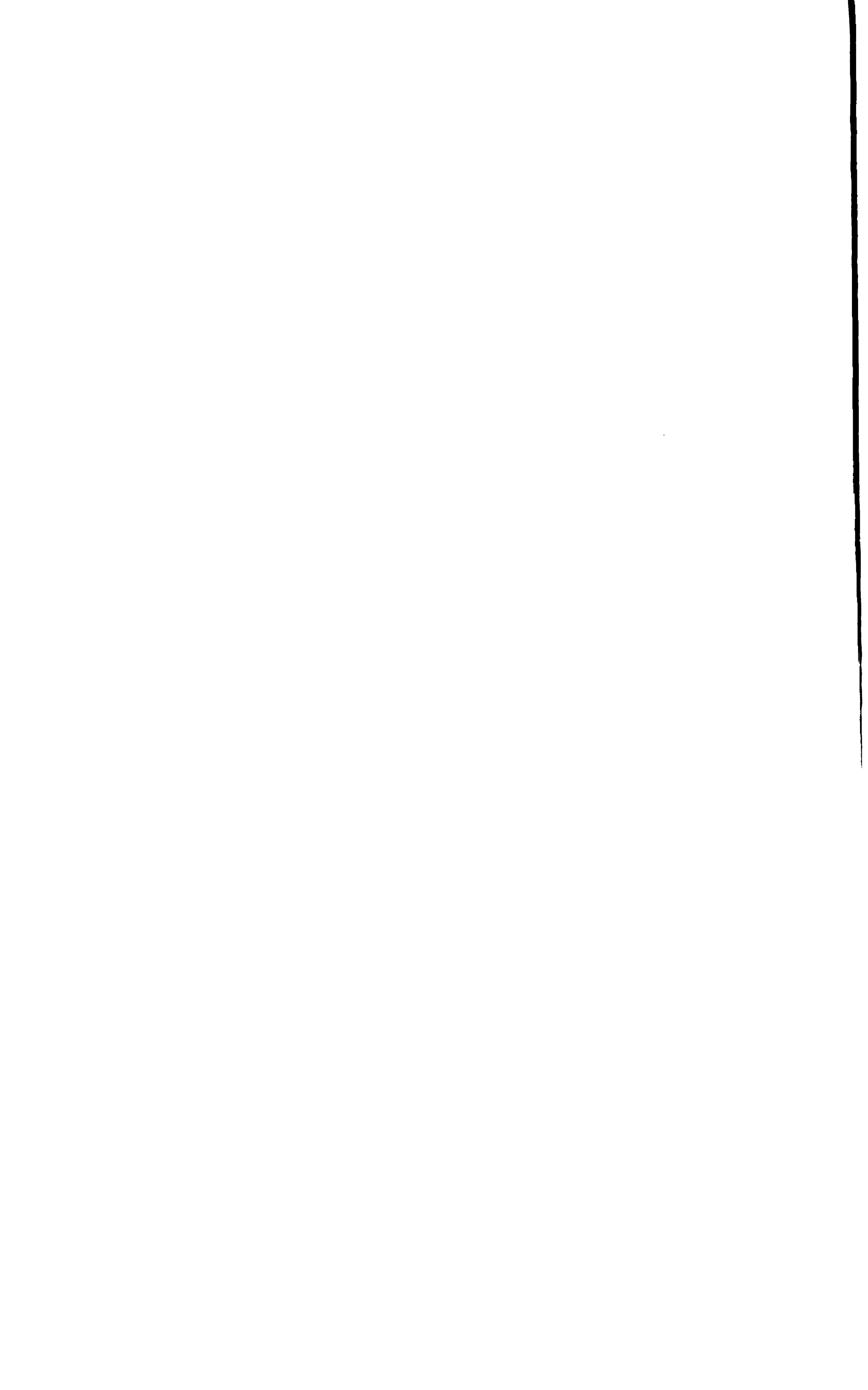




Biochemische Zeitschrift

Beiträge
zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, **C. von Noorden**-Frankfurt a. M.,
E. Salkowski-Berlin, **A. von Wassermann**-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. **Neuberg**-Berlin

Hunderteinunddreißigster Band



Berlin

Verlag von Julius Springer

1922

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig

Inhaltsverzeichnis.

Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin,

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, M. Bergmann-Berlin-Dahlem, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin-Dahlem, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin-Dahlem, K. Hess-Berlin-Dahlem, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, A. Koch-Göttingen, M. Kochmann-Halle a. S., F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Berlin, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Greifswald, L. Michaelis-Berlin, H. Molisch-Wien, J. Morgenroth-Berlin, E. Münzer-Prag, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-St. Petersburg, T. Sasaki-Tokio, A. Scheunert-Berlin, A. Schloßmann-Düsseldorf, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, P. Trendelenburg-Rostock, O. Warburg-Berlin, E. Widmark-Lund, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

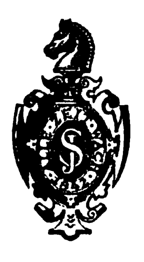
Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hunderteinunddreißigster Band

Erstes und zweites Heft

Ausgegeben am 29. Juli 1922



Berlin
Verlag von Julius Springer
1922

Die **Biochemische Zeitschrift**

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des laufenden Bandes im Umfange von 40 Bogen beträgt M. 360.—.

Der für diese Zeitschrift berechnete Bandpreis hat seine Gültigkeit nur während der Dauer des Erscheinens. Der Verlag muß sich bei der Unsicherheit der Entwicklung der wirtschaftlichen Verhältnisse vorbehalten, den zurzeit geltenden Preis nach Abschluß des Bandes zu erhöhen.

Die Biochemische Zeitschrift ist durch jede Buchhandlung sowie durch die unterzeichnete Verlagsbuchhandlung zu beziehen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens 2 Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Redakteur,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Die Verfasser erhalten 100 Sonderabdrücke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von 1½ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur 75, weitere gegen Berechnung.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer
Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

181. Band. **Inhaltsverzeichnis.** Heft 1/2.

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe III. Umschlagseite!

Über den Einfluß von Mineralwasser auf den Kohlenhydratumsatz durch Hefen.

Von

Paul Mayer (Karlsbad).

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 17. März 1922.)

Seit Dezennien steht das Problem zur Erörterung, wie der Einfluß bestimmter Mineralwässer auf den Stoffwechsel zu deuten ist. Besonderes Interesse ist stets der Frage entgegengebracht worden, wie bestimmte Thermalquellen, namentlich die Karlsbader Sprudel, auf den Kohlenhydratumsatz wirken.

Auf Grund mannigfacher Erfahrungen ist man neuerdings zu der Ansicht gelangt, daß der Effekt der genannten Wässer auf den Kohlenhydratumsatz wohl kein einheitlicher ist, sondern durch mehrere Faktoren bedingt wird. Ich selbst[1]) habe vor einer Reihe von Jahren festgestellt, daß in einem alkalischen Milieu nach Art der Karlsbader Quellen der Traubenzucker im Licht eine Zersetzung erleidet, die ohne gleichzeitige Bestrahlung ausbleibt; es entstehen unter Mitwirkung der absorbierten Strahlen flüchtige Säuren, Aldehyde sowie Glucoson. Diese Zerfallsprodukte treten bei schwacher Erwärmung, etwa bei Körpertemperatur, auf; wenn man höhere Erhitzungsgrade nicht vermeidet, so gesellen sich dazu hauptsächlich thermische Zerstörungsprozesse, welche auch Gase, wie Kohlenoxyd, Wasserstoff und Methan, liefern. Neuerdings zeigten *Wiechowski*[2]) und seine Mitarbeiter *Sgalitzer*[3]) und *Stransky*[4]), daß unter dem Einflusse des Karlsbader Wassers eine *Anreicherung des Organismus an mineralischen Bestandteilen*, besonders an Phosphaten, eintritt. Diese könnten eine Einwirkung auf den Zuckerumsatz ausüben.

---

[1]) *P. Mayer*, diese Zeitschr. **32**, 1. 1911.

[2]) *Wiechowski*, Zeitschr. f. Balneol., Klimatol. u. Kurorthyg. **5**, 433; 1912; Prager med. Wochenschr. **39**, 24; 1914; Wien. med. Wochenschr. **34**; 1921.

[3]) *Sgalitzer*, Zeitschr. f. Balneol., Klimatol. u. Kurorthyg. **7**, 1. 1914.

[4]) *Stransky*, diese Zeitschr. **122**, 1. 1921.

Mir scheint nun ein besonderer Weg gangbar, um in die Möglichkeiten einen gewissen Einblick zu gewinnen, die für eine Abänderung des Kohlenhydratabbaues unter dem Einfluß von Mineralwässern bestehen.

Vor 6 Jahren haben *Neuberg* und *Färber*[1]) gefunden, daß in alkalischem Milieu eine Abartung des Zuckerabbaus durch Hefe statt hat. Sie fanden nämlich, daß eine gesteigerte Bildung von Glycerin eintritt und gleichzeitig Acetaldehyd oder seine Umwandlungsprodukte in erhöhtem Maße zutage treten.

Nun hat die Forschung der letzten Jahre gelehrt, daß in wesentlichen Grundzügen der Zuckerumsatz im Tierkörper mit dem in der Hefezelle parallel geht. Die gegenwärtige Auffassung ist etwa die, daß die ersten Stufen des Zerfalls die selben sind; daß bei der Hefe, die ein anaerobes Lebewesen ist, der Vorgang aber nicht zu Ende kommt, sondern daß er neben Kohlendioxyd einen unvollständig oxydierten Stoff, den Weingeist, liefert. Hingegen zieht man für den Tierkörper mit ausgeprägt oxydativem Stoffumsatz in Betracht, daß ein schon vor der Alkohol- und Kohlensäurestufe liegendes Zwischenglied dem oxydativen Abbau anheimfällt.

Wenn also der Nachweis zu führen war, daß der Zuckerabbau in einer Mineralwasserlösung eine ähnliche Abartung erfährt wie bei künstlicher Zufügung alkalisch reagierender Salze, so kann man mit Reserve daran denken, daß die Zufuhr alkalischer Bestandteile ebenfalls eine Änderung der normalen Zuckerspaltung im Tierkörper zur Folge hat. *Neuberg*, *Reinfurth* und *Hirsch* haben die ältere Feststellung von *Neuberg* und *Färber* nach der quantitativen Seite hin ausgebaut und gezeigt[2]), daß dabei eine Spaltung des Zuckers in Essigsäure, Äthylalkohol, Kohlensäure und Glycerin einsetzt, gemäß der Gleichung

$$2\,C_6H_{12}O_6 + H_2O = CH_3 \cdot COOH + C_2H_5OH + 2\,CO_2 + 2\,C_3H_8O_3.$$

Es galt nun zu ermitteln, ob gleich den von den Autoren verwendeten reinen Salzen auch die in den Quellen vorhandenen Salzgemische, d. h. Gemenge von doppelt-kohlensauren Alkalien, vorwiegend Natriumbicarbonat, mit sog. Neutralsalzen, wie Glaubersalz und Chlornatrium, in ähnlicher Weise die vorerwähnte Art der Zuckerzerlegung herbeiführen, die man die *dritte Vergärungsform* nennt.

Versuche mit *Karlsbader Mühlbrunnen* zeigten in der Tat, daß sich der erwartete Erfolg einstellte, wenn auch nicht besonders kräftig. Ich konnte eine mäßige Steigerung der Glycerinmenge und ein entsprechendes Absinken des Alkoholertrages im Vergleiche mit der gewöhnlichen Zuckerspaltung verzeichnen.

---

[1]) *Neuberg* und *Färber*, diese Zeitschr. **78**, 238. 1916.

[2]) *Neuberg* und *Reinfurth*, diese Zeitschr. **89**, 365 und **92**, 234; 1918; *Neuberg* und *Hirsch*, diese Zeitschr. **96**, 175 und **100**, 304. 1919; *Neuberg*, *Hirsch* und *Reinfurth*, diese Zeitschr. **105**, 307. 1920.

Aus den Versuchen von *Wiechowski* und seinen Mitarbeitern über die Wirkungen des Karlsbader Wassers weiß man nun aber, daß eine Anreicherung des menschlichen Organismus mit den zugefügten Mineralbestandteilen eintreten kann, und ich habe daher keine Bedenken getragen, die Versuche mit *Karlsbader Salz* anzustellen und zwar mit solchen Mengen, wie sie etwa auch therapeutische Verwendung finden.

Bei dieser Versuchsanordnung waren die *Ausschläge bedeutend*. Da es mir lediglich auf die Konstatierung dieser Tatsachen ankam, habe ich mich beschränkt auf die Bestimmungen von Alkohol und von Glycerin, welche die stärksten Abweichungen von der Norm zeigten.

Als gleichmäßiges Ergebnis aller Versuche kann ich angeben, daß unter der Einwirkung der im Karlsbader Wasser enthaltenen Mineralbestandteile eine erhebliche Verringerung der Alkoholausbeute und eine entsprechende Erhöhung des Glycerinertrages einsetzt. Nach den von *Neuberg*, *Reinfurth* und *Hirsch*[1]) aufgestellten Formeln kann man berechnen, daß der Zucker, der in allen meinen Versuchen vollständig vergoren war, praktisch in Produkten der dritten Vergärungsform wiedergefunden wird. Dabei habe ich noch auf folgende Ergebnisse hinzuweisen:

Das Karlsbader Wasser ist nicht eine Lösung allein von Natriumbicarbonat, sondern enthält außer anderen Bestandteilen noch in wesentlicher Menge Chlornatrium sowie Natriumsulfat. Ich habe daher auch diese Salze in den Kreis meiner Untersuchungen gezogen und zwar deshalb, weil keine präzisen Angaben über die Natur der Vergärung in Lösungen solcher sog. Neutralsalze vorliegen. Ich fand nun, daß Natriumsulfat oder Kochsalz, jedes für sich, keinen Einfluß auf die Art des Zuckerumsatzes ausübt. Äthylalkohol und Glycerin entstanden in den normalen Mengen. Wohl aber zeigten *Kombinationsversuche von Natriumsulfat bzw. Kochsalz mit Natriumbicarbonat*, daß bei einem Verhältnis der genannten Mineralstoffe, wie sie im Karlsbader Salz vorliegen, die Wirkung des Natriumhydrocarbonats nicht unbeträchtlich erhöht ist. Das trat namentlich beim Glaubersalz zutage, und das Gleiche ergab sich für die Mischung von Kochsalz mit Natriumbicarbonat, nur daß dabei der verstärkende Einfluß des Chlornatriums geringer blieb. Die Größe der Abänderung ist abhängig von der molekularen Konzentration, d. h. schwächere Salzkonzentrationen haben einen geringeren Effekt als stärkere.

Zusammenfassend kann ich also folgendes meinen Versuchen entnehmen:

1. Karlsbader Wasser als solches leitet den Zerfall des Zuckers nach der dritten Vergärungsform ein.

---

[1]) *Neuberg, Hirsch* und *Reinfurth*, l. c.

2. Karlsbader Salz bewirkt diese Form der Zuckerzersetzung in ausgesprochenem Maße. Es treten stark verminderte Mengen Alkohol und sehr erhöhte Glycerinquantitäten auf.

3. Die Wirkung des im Karlsbader Salz enthaltenen Natriumbicarbonats wird durch das gleichzeitig vorhandene Natriumsulfat gesteigert.

4. Ähnlich dem Glaubersalz fördert Chlornatrium, wenn auch etwas schwächer.

5. Die genannten einfachen Salze Na_2SO_4 und NaCl allein haben keinen Einfluß auf die Form des Zuckerzerfalls; es tritt damit die normale alkoholische Gärung ein.

Versuche.

Ohne die verschiedenen Modifikationen anführen zu wollen, in denen ich die Versuche angestellt habe, gebe ich für die wichtigsten Resultate nachstehende Belege.

A. Karlsbader Wasser.

Versuch 1: 95 g *Rohrzucker*, entsprechend 100 g Hexosen, wurden in 1 l Karlsbader Mühlbrunnen gelöst. Hinzugefügt wurden 100 g Hefe der Rasse XII vom *Institut für Gärungsgewerbe in Berlin*. Die Vergärungsdauer betrug 48 Stunden. Nach dieser Zeit waren in einem aliquoten Teile weder Saccharose noch Invertzucker nachzuweisen. Zur Bestimmung des Alkohols und des Glycerins hielt ich mich an die im *Neuberg*schen Laboratorium ausgearbeiteten Vorschriften. Erhalten wurden, berechnet auf die Gesamtmenge, 45,63% Alkohol und 3,25% Glycerin.

Versuch 2: Mit der gleichen Hefe wurden ebenfalls 95 g *Rohrzucker* vergoren, aber in einem Liter Berliner Leitungswasser (an Stelle Karlsbader Mühlbrunnens). Der Versuch wurde gleichzeitig angesetzt und zur selben Zeit beendet. Die genauen Bestimmungen von Alkohol und Glycerin ergaben 48,92% Alkohol und 2,10% Glycerin, d. h. vollkommen normale Werte.

Man sieht aus dieser Gegenüberstellung, daß eine zwar nicht beträchtliche, aber doch unverkennbare Wirkung des Karlsbader Wassers vorhanden ist, die sich in der Verminderung der Alkoholproduktion und in der Erhöhung der Glycerinbildung ausdrückt.

B. Versuche mit Karlsbader Salz (pulverförmig).

Versuch 3: 95 g *Saccharose* (= 100 g Monosaccharid) wurden zusammen mit 50 g Karlsbader Salz in einem Liter Leitungswasser kalt gelöst und mit 100 g Hefe M vergoren. Nach 35stündiger Digestion war kein Zucker mehr nachzuweisen. Gefunden wurden insgesamt 39,20% Alkohol und 10,16% Glycerin.

Versuch 4: Der Kontrollversuch, der mit Leitungswasser und gleichzeitig, aber ohne Karlsbader Salz, angesetzt war, lieferte 48,28% Alkohol und 2,02% Glycerin.

Man erkennt, daß die Glycerinsteigerung im Mineralsalzversuch rund 500% gegenüber dem normalen Ansatz betrug.

Versuche 5 und 6: Die Wiederholung der Versuche 3 und 4 mit Hefe Senst unter sonst identischen Bedingungen lieferte 40,00% *Alkohol und* 8,43% *Glycerin im Salzansatz*, während die mineralstofffreie Kontrolle 48,48% Alkohol und 1,79% Glycerin ergab.

Die zusammengehörigen *Versuche 7, 8, 9, 10* sind in folgender Weise angestellt:

Im *Versuch 7* wurden 100 g *Glukose* mit einem Liter Wasser, 50 g Karlsbader Salz und 100 g Hefe, Rasse XII *(des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin)*, zusammengebracht.

Im *Versuch 8* waren 100 g Hexose, 1 l Wasser und 18 g Natriumbicarbonat, d. h. die in 50 g Karlsbader Salz vorhandene Menge Natriumhydrocarbonat, zugegen, außerdem 100 g derselben Hefe XII.

Im *Versuch 9* waren 100 g Dextrose in 1 l Wasser mit 100 g Hefe und 9 g Kochsalz angewendet; die Natriumchloridmenge ist diejenige, welche in 50 g Karlsbader Salz vorkommt.

Versuch 10 entsprach dem Versuch 9 mit dem Unterschiede, daß statt des Kochsalzes 20,8 g Glaubersalz zugefügt wurden, d. h. ein Quantum, welches das Natriumbicarbonat in 50 g Karlsbader Wasser begleitet.

Die Versuchsergebnisse sind ganz eindeutig und in folgender Tabelle zusammengestellt.

Versuch	7	8	9	10
Alkoholausbeuten	39,48	42,10	48,42	48,18
Glycerinausbeuten . . .	9,12	6,74	2,20	1,95

Die Serie der Versuche 7—10 ist gleichzeitig bei 37° im Thermostaten bebrütet gewesen; Versuchsdauer überall 48 Stunden[1]).

Die *Versuche 11, 12, 13 und 14* stellen weitere Ergebnisse einer Kombinationsreihe dar. In Versuch 11 wurde soviel Karlsbader Salz (78 g) in 1 Liter Wasser angewandt, daß dessen Gehalt an Natriumbicarbonat genau $^1/_3$ m in der Lösung war.

Im Versuch 12 gelangte $^1/_3$ mol Natriumbicarbonat (28 g) zur Benutzung.

Im Versuch 13 war dieselbe Menge Natriumbicarbonat (28 g) + 14 g Kochsalz, d. h. soviel NaCl wie in 78 g Karlsbader Salz, zugegen.

Bei Versuch 14 geschah die Vergärung in einer Lösung von wiederum 28 g Natriumbicarbonat und 32,4 g Na_2SO_4, entsprechend dem Gehalte beider Mineralstoffe in 78 g Karlsbader Salz.

Die Analysenresultate lasse ich wieder in Tabellenform folgen:

Versuch	11	12	13	14
Alkoholausbeuten	33,22	39,80	35,05	33,06
Glycerinausbeuten	13,90	9,52	9,90	11,46

Die Ergebnisse bedürfen keiner weiteren Erläuterung.

[1]) Nebenbei sei bemerkt, daß gesteigerte Salzkonzentrationen die Gärung verlangsamen, bezw. hemmen können.

Zur Kenntnis des Mumifizierungsprozesses.

Von

S. Goy und E. Wende.

(Aus dem Untersuchungsamt der Landwirtschaftskammer Königsberg.)

(Eingegangen am 8. April 1922.)

Von dem derzeitigen Leiter des Instituts für gerichtliche Medizin, Herrn Privatdozent Dr. *Müller-Hess*, wurden uns zwei mumifizierte Leichen neugeborener Kinder übergeben, deren Mütter versucht hatten, diese beiseite zu schaffen. Die eine Kindesleiche wurde auf dem Boden verborgen, die andere in einem Ofenloch aufgefunden; dort haben die Leichen etwa 1 Jahr gelegen. Die Körper waren bei der Auffindung äußerlich gut erhalten, im Inneren aber nahezu vollständig hohl, die Mumifizierung erstreckte sich also nur auf die äußeren Partien, welche der Luft und damit der Austrocknung am meisten ausgesetzt waren. Daß es sich bei der Mumifizierung in diesen Fällen nur um ein rasches Austrocknen handelt, welches durch die besonderen Lagerungsverhältnisse der kleinen Leichen begünstigt wurde, geht aus dem folgenden analytischen Befund hervor. Die Untersuchungen wurden an 2 verschiedenen, entgegengesetzten Stellen der Körper ausgeführt, um zu sehen, ob die Körperseite, auf der die Leichen gelegen hatten, anders zusammengesetzt war als die entgegengesetzte. Unterschiede ergaben sich dabei nicht; dagegen zeigten sich solche in der Zusammensetzung der Substanz der äußeren Hautpartien gegenüber den noch im Innern der Leichen erhaltenen Muskelpartien; der höhere Asche- und namentlich Eisengehalt der Hautpartien ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß die Körper nach der Geburt kaum gereinigt worden sein dürften.

I. Kinderleiche vom Boden:

Von 2 verschiedenen Stellen:

1. Partie:	Hautpartie	Muskelpartie
Wassergehalt	5,03%	3,58%
Mineralbestandteile .	3,00%	2,20%
Eisengehalt	0,6 mg pro 100 g	0,3 mg pro 100 g
2. Partie:	**Hautpartie**	**Muskelpartie**
Wassergehalt	4,94%	3,70%
Mineralstoffe	2,98%	2,16%
Eisengehalt	0,71 mg pro 100 g	0,4 mg pro 100 g

II. Kinderleiche aus dem Ofen:

Von 2 verschiedenen Stellen:

a)	Hautpartie	Muskelpartie
Wassergehalt	7,34%	5,21%
Mineralstoffe	3,12%	2,41%
Eisengehalt	0,51 mg pro 100 g	0,35 mg pro 100 g

b)	Hautpartie	Muskelpartie
Wassergehalt	7,03%	4,95%
Mineralstoffe	3,02%	2,19%
Eisengehalt	0,62 mg pro 100 g	0,34 mg pro 100 g

Der Wassergehalt ist durch Austrocknung so herabgesetzt, daß das Fleisch dadurch ohne weiteres haltbar ist; bei so geringem Wassergehalt ist jede organische Substanz ohne weiteres längere Zeit haltbar.

Über zwei Leichenwachsuntersuchungen.

Von

S. Goy und **E. Wende.**

(Aus dem Untersuchungsamt der Landwirtschaftskammer Königsberg.)

(Eingegangen am 8. April 1922.)

Leiche I.

Durch den derzeitigen Leiter des Instituts für gerichtliche Medizin, Herrn Privatdozent Dr. *Müller-Hess*, wurden uns 2 Leichenwachsbildungen überwiesen, deren Untersuchungsbefund im folgenden mitgeteilt sei.

Bei dem folgenden Leichenwachs handelt es sich um einen durch Selbstmord durch Erhängen verstorbenen Mann, dessen Leiche etwa 5 Jahre in einem ziemlich hochgelegenen Königsberger Friedhof begraben war. Die Leichenwachsbildungen zeigten sich hauptsächlich an Brust und Hals, so daß die Strangulationsmarke deutlich zu erkennen war. Die Untersuchung erstreckte sich auf die Bestimmung folgender Konstanten der Substanz:

Die Masse enthält:

Mit Äther extrahierbar (Rohfett) . .	98,29 %
Mineralbestandteile	0,26 „
davon Kalk (CaO)	0,017 „
Magnesia (MgO)	0,013 „
freies Glycerin	0,04 „

Das Rohfett ergab folgendes:

Ammoniakgehalt	0,18%
Refraktion des Fettes bei 40%	32,5
Verseifungszahl	225,7
Säurezahl	194,9
Reichert-Meissl-Zahl	13,62 als Buttersäure
Polenske-Zahl	2,9
Jodzahl	56,9
Ölsäure aus der Jodzahl berechnet	63,21
Mittleres Molekulargewicht der Gesamtfettsäuren	246,7
Mittleres Molekulargewicht der wasserlöslichen flüchtigen Fettsäuren	118,6

Das Molekulargewicht liegt etwa bei dem der Caprinsäure.

Mittleres Molekulargewicht der wasserunlöslichen Fettsäuren 205,5

Das Molekulargewicht liegt etwa bei dem der Tridecylsäure.

Unverseifbares 14,85%

Das Unverseifbare enthält:

Cholesterin	nicht vorhanden
Stickstoff	„ „
Calcium	Spuren
Kohlenstoff	58,36%
Wasserstoff	7,32%

Die Reaktion des Leichenwachses war sauer.

Die Bestimmungen wurden in folgender Weise ausgeführt:

1. *Mineralbestandteile*: 5 g Leichenwachs wurden in einer Platinschale mit Hilfe eines Pilzbrenners verascht.

Substanz	27,0911	Asche	22,1043
Schale	22,0911	Schale	22,0911
	5,0000		0,0132 = 0,264%

2. *Bestimmung des Kalkes und der Magnesia in der Asche*:

CaO. Die Asche wurde in verdünnter HCl gelöst, mit Wasser verdünnt, mit Ammoniak versetzt und solange gekocht, bis der Geruch nach Ammoniak nicht mehr wahrnehmbar war. Der äußerst geringe Niederschlag von $Fe(OH)_3$ wurde abfiltriert und im Filtrat der Kalk bestimmt, indem das Filtrat erhitzt und nach Zusatz von Ammoniak und oxalsaurem Ammon noch einige Zeit gekocht wurde. Nachdem sich der Niederschlag auf dem Wasserbade abgesetzt hatte, wurde nach einigen Stunden filtriert und das oxalsaure Calcium mit heißem Wasser ausgewaschen, getrocknet und 10 Minuten im Gebläse geglüht.

CaO	13,3098
Tiegel	13,3005
	0,0083 CaO = 0,017%.

MgO. Das Filtrat des Kalkniederschlages wurde etwas eingedampft und nach dem Erkalten phosphorsaures Natrium und Ammoniak hinzugesetzt. Nach Umrühren und Reiben mit dem Glasstabe an den Wandungen des Glases entstand ein Niederschlag von phosphors. Ammon. Magnesia. Nach etwa 24 Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert, mit verdünntem Ammoniak ausgewaschen, im Platintiegel geglüht und gewogen.

Niederschlag	13,3070
Tiegel	13,3050
	0,0020 $Mg_2P_2O_7$ = 0,015% MgO.

3. *Bestimmung des freien Glycerins*: Die Bestimmung des Glycerins wurde in der Weise ausgeführt, daß 10 g Leichenwachs in einer Schale mit Quarzsand und Kalkmilch innig verrieben und das Gemisch auf dem Wasserbade mit Alkohol extrahiert wurde. Der weitere Gang der Bestimmung erfolgte in gleicher Weise wie bei Fleischsaft.

Rückstand	8,1754
Wägegläschen	8,1714
	0,0040 = 0,04%.

4. *Bestimmung des Ammoniaks*: Für die Ermittlung des Ammoniakgehaltes des Fettes war die direkte Destillation der Substanz nicht angängig, da infolge der übergroßen Schaumbildung ein Überspritzen nicht zu vermeiden war. 5 g Fett wurden daher mit verdünnter Schwefelsäure warm ausgeschüttelt, nach dem

Erkalten zu einem bestimmten Volumen aufgefüllt und nach dem Abfiltrieren in einem aliquoten Teile das Ammoniak bestimmt:

0,162% N — 0,18% Ammoniak.

5. *Bestimmung der Verseifungszahl des Fettes*: Die zur Ermittlung der Verseifungszahl angewandte Fettmenge betrug 0,9316 g. Das abgewogene Fett wurde in einem Kölbchen aus Jenenser Glas mit 25 ccm $^{n}/_{2}$-alkoholischer Kalilauge versetzt und unter Umschwenken $^{1}/_{4}$ Stunde im kochenden Wasserbade unter Verwendung eines 75 cm langen Kühlrohres erhitzt. Die noch heiße Lösung wurde dann mit $^{n}/_{2}$-Salzsäure titriert. Als Indicator wurde Phenolphtalein verwandt.

Vorgelegt 25 ccm Lauge	24,5 ccm	$^{n}/_{2}$-Salzsäure
zurücktitriert	10,35 „	„
verbraucht	14,15 ccm	

$$\frac{14{,}15 \cdot 28{,}055}{0{,}9316} = 225{,}7\ .$$

6. *Bestimmung der Säurezahl*: Die Bestimmung der Säurezahl erfolgte, indem 0,3939 g Fett mit 25 ccm Alkohol in einem mit Rückflußkühler versehenen Kölbchen auf dem Wasserbade zum Sieden erhitzt und nach Zusatz von Phenolphthalein heiß mit alkoholischer $^{n}/_{2}$-Kalilauge bis zur Rötung versetzt wurde.

Die verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter betrug 2,73 ccm $^{n}/_{2}$-Lauge:

$$\frac{2{,}73 \cdot 28{,}055}{0{,}3939} = 194{,}9\ .$$

7. *Bestimmung der Reichert-Meissl-Zahl*: 5 g Fett wurden in einem 300 ccm-Stehkolben aus Jenenser Glas mit 20 g Glycerin und 2 ccm Natronlauge (1 : 1) versetzt und über kleiner Flamme unter Umschwenken erhitzt. Die gebildete Seife wurde dann in der vorgeschriebenen Art weiter behandelt.

Die bei der Titration verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter um $^{1}/_{10}$ vermehrt, betrug 13,62 — Reichert-Meissl-Zahl nach Abzug der bei einem blinden Versuch verbrauchten Kubikzentimeter.

8. *Polenske-Zahl*: Nach der Bestimmung der Reichert-Meissl-Zahl wurde das Kühlrohr des Destillationsapparates, die zweite Vorlage, der 110 ccm-Kolben und das Filter 3 mal mit je 15 ccm Wasser ausgewaschen und das Filtrat beseitigt. Danach wurden die ungelöst gebliebenen Fettreste durch 3 maliges Waschen mit je 15 ccm neutralem 90 proz. Alkohol in Lösung gebracht und durch das Filter filtriert. Die vereinigten alkoholischen Filtrate wurden nach Zusatz von 3—4 Tropfen 1 proz. Phenolphthaleinlösung mit $^{n}/_{10}$-Alkalilauge titriert.

Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter betrug 2,9 = Polenske-Zahl.

9. *Bestimmung der Jodzahl nach Hübel*: 0,4898 g Fett wurden in 15 ccm Chloroform gelöst, mit 30 ccm Jodquecksilberchloridmischung versetzt und in der vorgeschriebenen Art weiterbehandelt.

Blinder Versuch:	30 ccm Jodquecksilberchloridmischung
	= 43,4 ccm $^{n}/_{10}$-Thiosulfatlösung
Hauptversuch	22,23 „ „
Gebundene Menge	21,17 ccm
Jod entsprechend	

$$21{,}17 \cdot 0{,}012692 = 0{,}2786962$$

$$\frac{0{,}27869 \cdot 100}{0{,}4898} = 56{,}9 = \text{Jodzahl.}$$

10. *Die Ermittlung des mittleren Molekulargewichtes* der Gesamtfettsäuren erfolgte durch Bestimmung des zur Neutralisation von 1 g Fettsäure erforderlichen Kaliumhydroxyds in Milligrammen (Neutralisationszahl) 227,6:

$$M = \frac{56\,160}{227,6} = 246,7\ .$$

11. *Die Bestimmung des mittleren Molekulargewichts* der in Wasser löslichen und der in Wasser unlöslichen flüchtigen Fettsäuren erfolgte im Anschluß an die Bestimmung der Reichert-Meissl-Zahl und der Polenske-Zahl, indem die austitrierten Lösungen von fettsaurem Alkali in einer Platinschale zur Trockne verdampft und im Wassertrockenschranke bis zum konstanten Gewicht getrocknet wurden. Aus dem ermittelten Gewichte der fettsauren Salze wurde das Molekulargewicht der Fettsäuren mit Hilfe der verbrauchten Alkalimenge berechnet.

Das Unverseifbare ist in Chloroform löslich, beim Erhitzen mit Schwefelsäure färbt es sich erst gelb, bei stärkerem Erhitzen rot, schließlich tritt Verkohlung ohne Entwicklung eines charakteristischen Geruchs ein.

Das Unverseifbare nimmt nach den Hautpartien der Menge nach zu. Es ist nicht einheitlich zusammengesetzt, da der Kohlenstoffgehalt und Wasserstoffgehalt schwankt. Ein Kohlenwasserstoff liegt nicht vor. Auffallend ist der hohe Prozentsatz an Unverseifbarem.

Das mittlere Molekulargewicht einer Mischung aus Stearin-Palmitin- und Ölsäure beträgt 286,6, das ermittelte der Gesamtfettsäuren weicht nicht allzu erheblich davon ab. Daß es niedriger ist, liegt daran, daß auch Säuren von niedrigerem Molekulargewicht vorhanden sind, wie aus der Reichert Meissl-Zahl und der Polenske-Zahl hervorgeht, welche einen Gehalt an flüchtigen Säuren anzeigen; das Molekulargewicht dieser Säuren ist, wie ermittelt, niedriger.

Rechnet man den überhaupt gefundenen Kalk- und Magnesiagehalt als an Fettsäuren gebunden, so ergibt sich ein Gehalt von höchstens 0,07% Kalk- und 0,09% Magnesiaseifen, und für Ammoniakseifen: 2,5%.

Im wesentlichen besteht die Masse aus freien Fettsäuren. Das bei der Aufspaltung des Fettes entstandene freie Glycerin ist nur noch in sehr geringer Menge in der Masse vorhanden.

Leiche II.

Bei der zweiten Leiche handelt es sich um ein etwa 1jähriges Kind, dessen Exhumierung wegen Giftmordverdacht angeordnet wurde.

Die Leiche hatte etwa $1^1/_2$ Jahre im Friedhof gelegen. Gift war in der Leiche nicht nachweisbar, das Kind war auch, wie die Ermittlungen ergaben, sehr wahrscheinlich an Lungenentzündung gestorben. An den nur sehr wenig erhaltenen und in geringer Menge vorhandenen Leichenteilen unterschieden sich deutlich 2 Substanzen verschiedener Art, die eine war grauweiß, die andere lebhaft rosa bis rot gefärbt. Diese Partien wurden getrennt untersucht, da die Möglichkeit bestand, daß hier verschiedene Zersetzungs- bzw. Umsetzungsstufen von Leichensubstanz vorlagen, ein wesentlicher Unterschied konnte trotz der verschiedenen Färbung nicht festgestellt werden. Die Untersuchung ergab:

	Weiße Substanz	Rötliche Substanz
Mit Äther extrahierbar (Rohfett)	70,09%	69,91%
Wasser	5,77%	5,93%
Mineralbestandteile	3,37%	3,30%
davon Kalk (CaO)	1,34%	1,28%
„ Magnesia (MgO)	1,05%	1,01%
Ammoniak in der fettfreien Substanz bestimmt	0,39%	0,43%
Freie Fettsäuren	13,31%	13,37%
Das Rohfett ergab folgendes:		
Refraktion des Fettes bei 40°	31,70	31,80
Verseifungszahl	231,10	229,30
Säurezahl	163,80	163,10
Reichert-Meissl-Zahl	12,38	12,77
Polenske-Zahl	1,76	1,92
Jodzahl	57,61	58,33
Ölsäure aus der Jodzahl berechnet	64,07%	64,87%
Mittleres Molekulargewicht der Gesamtfettsäuren	230,3	232,2
Mittleres Molekulargewicht der wasserlöslichen flüchtigen Säuren	124,7	128,4
Mittleres Molekulargewicht der wasserunlöslichen flüchtigen Säuren	309,6	317,3

Beide Partien sind also praktisch gleich zusammengesetzt. Sie bestehen in der Hauptsache aus Fett, welches zum geringen Teil, etwa zu einem Achtel, in Kalk-, Magnesia-, bzw. Ammoniakseife umgewandelt ist. Der überwiegende Teil des Fettes besteht aus freien Fettsäuren, der Rest aus Neutralfett.

Globulin und Albumin aus demselben Blutserum als immunisatorische Antagonisten.

Von

R. Doerr und **W. Berger.**

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel.)

(Eingegangen am 11. April 1922.)

Im Laufe ausgedehnter Untersuchungen[1]), welche wir über die Struktur des Serumeiweißes, über seine Variabilität, über den Ursprung und über die immunologischen Eigenschaften der das Serumprotein zusammensetzenden Komponenten ausgeführt haben, sahen wir uns auch vor die *Frage gestellt, ob und in welcher Weise sich die einzelnen Anteile, aus welchen sich das Serumeiweiß aufbaut, gegenseitig beeinflussen, falls sie gleichzeitig auf denselben reaktionsfähigen Organismus einwirken.* Die Berechtigung, eine experimentelle Beantwortung dieser Frage zu versuchen, war selbstverständlich zunächst von der Auffassung, die man sich über die Natur der Unterschiede der Fraktionen des Serumeiweißes bildet, unabhängig; sie war vorhanden, gleichgültig ob man im Fibrinoglobulin, Euglobulin, Pseudoglobulin und Albumin strukturchemisch charakterisierte Substanzen oder willkürliche Ausschnitte aus einer Reihe sieht, die durch fließende Variierung der physikalischen Eigenschaften eines Grundstoffes entstanden ist. Denn abgesehen von der Tatsache, daß sich beide Hypothesen gegenwärtig verfechten lassen und wirklich verfochten werden, entscheidet im vorliegenden Falle lediglich der Umstand, ob die *Antigen*funktionen der aufgezählten Fraktionen untereinander differieren oder nicht. Darüber kann aber nach der Mitteilung von *Dale* und *Hartley* sowie nach unseren eigenen, an anderer Stelle veröffentlichten Ergebnissen gar kein Zweifel bestehen; zwischen Euglobulin und Albumin aus Pferdeserum lassen sich Spezifitätsunterschiede nachweisen, die bei geeigneter Versuchsanordnung fast absolut sind und in Anbetracht des gemeinsamen Vor-

---

[1]) *Doerr* und *Berger,* Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **93,** 147. 1921. — *Berger,* Schweiz. med. Wochenschr. 1922, Nr. 9; Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 1922. — *Doerr* und *Berger,* Klin. Wochenschr. 1922; Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1922.

kommens beider Antigene im Blutplasma durch ihre scharfe Ausprägung überraschen. Mit diesen Spezifitätsunterschieden erscheint aber die — soweit wir bisher unterrichtet sind — einzige Vorbedingung jener eigentümlichen Interferenzphänomene erfüllt, welche auftreten oder auftreten können, wenn man zwei oder mehrere Antigene gleichzeitig oder kurz nacheinander parenteral einverleibt.

Bekanntlich haben *Benjamin* und *Witzinger* die ersten einschlägigen Beobachtungen 1911 publiziert. Sie fanden, daß große Dosen Pferdeserum die Sensibilisierung von Meerschweinchen mit Rinderserum verhindern, wenn sie vorher, gleichzeitig oder 24 Stunden später injiziert werden; ferner konstatierten sie, daß präventive Einspritzungen von Rinderserum beim Kaninchen die Bildung von Präcipitinen für Pferdeeiweiß verhindern, und daß die Produktion von Hammelhämolysinen bei derselben Tierart unterbleibt, wenn man der Injektion von Hammelerythrocyten eine massive Dosis Pferdeserum vorausschickt. Ganz allgemein formuliert lautet das aus diesen Versuchen ableitbare *Gesetz:* Ein an *Masse* dominierendes Antigen A unterdrückt oder schwächt die antigenen Funktionen einer kleineren, aber an sich sehr wirksamen Menge eines Antigens B, wenn das zeitliche Intervall zwischen der parenteralen Zufuhr von A und jener von B gleich Null oder relativ kurz ist. Den größten antagonistischen Effekt hat nach *Benjamin* und *Witzinger* das an Masse prävalierende A, wenn es *vor* B gegeben wird; die *gleichzeitige* Injektion beider Antigene wirkt etwas schwächer und am wenigsten wird B beeinträchtigt, wenn man A *nachträglich* dem Organismus beibringt. Wird B durch A nicht völlig annulliert, sondern bloß abgeschwächt, so kann dies darin zum Ausdruck kommen, daß der dem Antigen B entsprechende Antikörper (resp. Immunitätszustand) erst nach einer stark verlängerten Inkubation auftritt, welche nicht der de facto verwendeten, sondern einer weit kleineren B-Dosis entsprechen würde.

Diesen von *Benjamin* und *Witzinger* beschriebenen und sehr treffend als „*Konkurrenz der Antigene*" bezeichneten Antagonismus haben in der Folge *Julian Hermann Lewis* und *R. Weil* mit Hilfe des für diesen Zweck besonders geeigneten anaphylaktischen Meerschweinchenexperimentes zu bestätigen vermocht. Es sei nur kurz erwähnt, daß *Lewis* die sensibilisierende Wirkung von Pferdeserum verhindern konnte, wenn er dasselbe gemischt mit größeren Mengen Hunde-, Katzen- oder Menschenserum oder mit relativ hohen Dosen Eiereiweiß einspritzte; desgleichen erwies sich Hundeserum unter den gleichen Bedingungen als „Konkurrent" von Eiereiweiß. Umgekehrt störte aber auch ein Überschuß von Pferdeserum das Zustandekommen der aktiven Anaphylaxie gegen Eiereiweiß; jedes der beiden Antigene konnte somit das andere unterdrücken, wenn es durch seine Masse im Vorteil war, *die „Konkurrenz" repräsentierte ein reziprokes, nur von quantitativen Beziehungen bestimmtes Verhältnis zwischen 2 Antigenen von verschiedener Spezifität, aber offenbar von gleicher Intensität der von ihnen verursachten immunisatorischen Reizwirkung.* Hinsichtlich aller übrigen Details und ihrer kritischen Diskussion sei auf *R. Doerr*, Die Anaphylaxieforschung (in Band V der Weichardtschen Ergebnisse) verwiesen.

Wie man erkennt, war also die Prüfung der verschiedenen Fraktionen, in welche das Gesamtprotein einer Serumart zerlegt werden kann, mit Hilfe des anaphylaktischen Konkurrenzversuches durchaus begründet und schien mit Rücksicht auf die Eigenart der hierbei in Betracht kommenden Antigene von ganz besonderem Interesse. Zur Fraktionierung des Serumeiweißes bedienten wir uns einer speziellen Technik der Fällung durch Ammonsulfat mit anschließender Reinigung der gewonnenen Präparate; das Verfahren haben wir in einer anderen Arbeit (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1922) ausführlich wiedergegeben, so daß sich das nochmalige Eingehen auf diese Methodik erübrigt. Es wurden aus klarem, hämoglobinfreiem Pferdeserum 4 Fraktionen hergestellt, und zwar:

1. „Euglobulin" = A, zwischen 0 und 33% Sättigung mit Ammonsulfat;
2. „Pseudoglobulin" = B, „ 33 „ 50 „ „ „ „
3. „Albumin C" = C, „ 56 „ 66 „ „ „ „
4. „Albumin D" = D, „ 66 „ 99 „ „ „ „

Zur Konkurrenz brachten wir die extremen Glieder der vorstehenden Ammonsulfatfällungsreihe, nämlich die mit A und D bezeichneten Eiweißlösungen, da unsere früheren Untersuchungen ergeben hatten, daß zwischen A und D die größten Differenzen bestehen, nicht nur hinsichtlich der Spezifität, sondern auch in bezug auf die biologische Aktivität, d. h. die Intensität der Antigenfunktionen. Das mit diesen beiden Fraktionen ausgeführte Experiment ließ daher die stärksten Ausschläge, somit auch die eindeutigsten Resultate erwarten. Der refraktometrisch und mit der *Kjeldahl*-Methode bestimmte Eiweißgehalt betrug

für die Lösung A 2,3%,
für die Lösung D 1,9%,

war also annähernd gleich; der kleine Unterschied konnte bei der ganzen Anlage des Versuches füglich vernachlässigt werden.

Wichtigkeit war dem Umstande beizumessen, daß sowohl das Euglobulin (A) wie das Albumin (D) in Dosen angewendet wurden, welche innerhalb der eingehaltenen Inkubationsfrist optimal präparierten, d. h. eine maximale homologe Hypersensibilität erzeugten; man durfte dann einer zu beobachtenden Störung oder Verhinderung der aktiven Sensibilisierung eine um so größere Bedeutung beilegen. Nun hatten sehr genaue Vorversuche ergeben, daß einige Hundertel Kubikzentimeter sowohl bei A wie bei D ein Optimum der anaphylaktogenen Wirkung darstellten; wir wählten somit 0,04 ccm als sensibilisierende Menge, statteten jedoch außerdem den Hauptversuch mit allen erforderlichen Kontrollen aus, so daß die Gesamtzahl der eingestellten Meerschweinchen in 5 Gruppen zerfiel:

I. In solche, welche mit 0,04 ccm der *Euglobulinlösung* A subcutan vorbehandelt waren;

II. solche Meerschweinchen, die 0,04 ccm der ***Albuminlösung*** D erhalten hatten;

III. Tiere, bei denen die aktive Sensibilisierung mit einem Gemisch der *optimalen Dosen* von ***Euglobulin und Albumin*** aa durchgeführt wurde, denen also 0,04 ccm A plus 0,04 ccm D injiziert worden waren;

IV. Tiere, welche die optimale Dose von ***Euglobulin*** (A 0,04 ccm) plus dem ***hundertfachen Volum*** von ***Albumin*** (D 4,00 ccm) bekamen und endlich

V. Tiere, welche umgekehrt mit der optimalen Dosis ***Albumin*** (D 0,04 ccm) plus dem ***hundertfachen Multiplum*** von ***Euglobulin*** (A 4,00 ccm) gespritzt wurden.

Sämtliche präparierenden Injektionen erfolgten an einem Tage. Die Prüfung des anaphylaktischen Zustandes wurde nach Ablauf von 21 Tagen vorgenommen, und zwar durch intravenöse Injektion fallender Antigenquanten, so daß nicht nur das Bestehen der Hypersensibilität, sondern auch der Grad derselben ermittelt werden konnte.

Ergebnis:

Gruppe I, präpariert mit **0,04 ccm A** subcutan, nach 21 Tagen mit fallenden Mengen A intravenös reinjiziert:

Gewicht d. Meerschw.	Reinjizierte Dosis A	Resultat
300 g	0,5 ccm	+ 3′
280 „	0,2 „	+ 4′
330 „	0,1 „	s. S., fällt auf die Seite, erholt sich aber
320 „	0,08 „	+ 5′
325 „	0,07 „	s. S., fällt um, überlebt
300 „	0,05 „	dgl.
340 „	0,01 „	Null

Gruppe II, subcutan präpariert mit **0,04 ccm D**, nach 21 Tagen intravenös reinjiziert mit fallenden Mengen D:

Gewicht d. Meerschw.	Reinjizierte Dosis D	Resultat
320 g	2,0 ccm	+ 3′
300 „	1,5 „	+ 3′
270 „	1,0 „	+ 4′
310 „	0,5 „	+ 4′
290 „	0,3 „	+ 4′
300 „	0,1 „	+ 4′
320 „	0,1 „	l. S.

Sowohl A als D hatten demnach anaphylaktogen gewirkt; für die A-Tiere betrug die minimale tödliche Reinjektionsdosis der homologen Fraktion 0,08, für die D-Tiere 0,1 ccm.

Gruppe III, subcutan präpariert mit optimalen Mengen von A *und* D (**0,04 ccm A + 0,04 ccm D**), nach 21 Tagen intravenös reinijiziert mit fallenden Mengen A sowie mit fallenden Mengen D, um die Größe der Hypersensibilität gegen beide Antigene auszutitrieren.

a) Reinjektion mit A-Lösung.

Gewicht d. Meerschw.	Reinjizierte Dosis A	Resultat
300 g	0,5 ccm	+ 3′
270 „	0,2 „	+ 3′
370 „	0,1 „	+ 3′
320 g	0,05 „	l. S.
300 „	0,02 „	l. S.
340 „	0,01 „	fast Null

b) Reinjektion mit D-Lösung.

Gewicht d. Meerschw.	Reinjizierte Dosis D	Resultat
340 g	0,3 ccm	+ 3′
320 „	0,1 „	+ 5′
340 „	0,08 „	l. S.
280 „	0,05 „	fast Null

Gleiche und *optimale Dosen* von **Euglobulin** und **Albumin** schienen sich in ihren **Antigenfunktionen nicht zu beeinträchtigen.** Es kamen nicht nur beide Formen spezifischer Überempfindlichkeit nebeneinander zur Entwicklung, sondern es blieben auch die intravenös letalen Reinjektionsmengen von A und D die nämlichen wie bei den Meerschweinchen der Gruppen I und II, welche nur mit einer der beiden Lösungen vorbehandelt worden waren.

Dagegen änderten sich die Reaktionen, wenn man die optimale Dosis eines Antigens mit einem großen **Überschuß** des anderen simultan einverleibte.

Gruppe IV, subcutan präpariert mit **0,04 ccm A + 4,00 ccm D,** nach 21 Tagen reinjiziert mit fallenden Mengen A-Lösung:

Gewicht d. Meerschw.	Reinjizierte Dosis A	Resultat
315 g	0,2 ccm	+ 3′
300 „	0,1 „	+ 3′
260 „	0,1 „	s. S., überlebt
320 „	0,1 „	s. S., überlebt
300 „	0,08 „	s. S., + 30′
280 „	0,05 „	s. S., fällt um, überlebt

Gruppe V, subcutan präpariert mit **0,04 ccm D + 4,00 ccm A,** nach 21 Tagen intravenös reinjiziert mit fallenden Mengen D-Lösung:

Gewicht d. Meerschw.	Reinjizierte Dosis D	Resultat
270 g	5,0 ccm	**Null**
310 „	2,0 „	anfangs keine, dann protrahierte S., erholt sich bald und überlebt
270 „	1,0 „	Null
270 „	0,5 „	l. S.
276 „	0,3 „	Null
310 „	0,1 „	fast Null

Der ***hundertfache Überschuß Albumin D*** zeigte somit so gut wie gar ***keinen Einfluß*** auf optimal sensibilisierende Dosen von Euglobulin;

dagegen wurde die Antigenfunktion optimaler Albuminquanten durch die gleichzeitige Zufuhr von hundertfachen Euglobulinmengen völlig aufgehoben.

Im Gegensatze zu den Verhältnissen, wie sie *J. H. Lewis* für Pferdeserum und Eiereiweiß, die im anaphylaktischen Konkurrenzversuch ohne Änderung des Resultates vertauscht werden dürfen, ermittelt hat, *fehlt somit zwischen Euglobulin und Albumin aus Pferdeserum die Reziprozität.* **Das Euglobulin vermag das Albumin zu verdrängen, aber nicht umgekehrt.** Daraus erhellt, daß das Übergewicht des Euglobulins über das Albumin im Konkurrenzversuch nicht ausschließlich davon abhängen kann, daß es in bedeutend größerer Masse zugeführt wird, sondern daß hier noch ein *qualitativer Faktor* im Spiele sein muß. Wir gehen wohl nicht fehl, wenn wir denselben darin suchen, daß dem *Euglobulin* eine höhere Wertigkeit, eine *größere Intensität der Antigenfunktion* zukommt als dem Albumin, ein Unterschied, für dessen reale Existenz wir auch andere Argumente (niedrigere Dosis sensibilisans minima des Euglobulins, kürzere Minimalinkubation) beizubringen vermochten. In den hier wiedergegebenen Versuchsreihen entfaltete das Euglobulin seine Dominanz über das Albumin allerdings nur unter der Voraussetzung, daß es auch an Masse erheblich überwog. Aber diese Aussage verliert ihren Wert, wenn man die extremen Bedingungen näher ins Auge faßt, unter welchen wir gearbeitet haben. Erstens wurde Euglobulin und Albumin simultan injiziert, während die präventive Zufuhr von Euglobulin nach *Benjamin* und *Witzinger* sowie *R. Weil* zweifellos besser gewirkt hätte; dann aber — und das ist für viele andere Erscheinungen, die in dieses Gebiet gehören, wichtiger — kam das Albumin in optimaler Präparierungsdosis zur Anwendung, und die damit sensibilisierten Meerschweinchen wurden nach einem für die volle Ausbildung der Albuminüberempfindlichkeit sehr günstigen Intervall reinjiziert, so daß also die Verhältnisse — absichtlich — so gewählt waren, daß sie der antagonistischen Beeinflussung des Albumins durch das Euglobulin zuwiderliefen. Das hatte den Zweck, den Ergebnissen größtmögliche Sicherheit zu verleihen, war aber natürlich nicht danach angetan, Aufschlüsse über die Grenzen zu bieten, bis zu welchen der Antagonismus von Albumin und Euglobulin noch in Erscheinung treten kann. Es ist daher sehr gut möglich, daß die Antigenfunktion nicht optimaler Dosen des Albumins auch dann gestört wird, wenn das gleichzeitig zugeführte Euglobulin an Masse nicht vorherrscht; wenn also jede quantitative Prävalenz ausgeschaltet erscheint und die „höhere biologische Wertigkeit" rein zur Auswirkung gelangt. Wir müssen uns wegen der mit derartigen Experimenten verbundenen Kosten vorbehalten, die weitere dosologische Analyse des Phänomens nachzutragen.

Die Tatsache aber, daß **Euglobulin und Albumin,** aus demselben Blutserum gewonnen, als **antagonistische Antigene** fungieren können,

steht fest und scheint uns noch weit mehr als die von *Dale* und *Hartley* sowie von uns mit Sicherheit nachgewiesenen *Spezifitätsdifferenzen* dafür zu sprechen, daß zwischen den einzelnen *Fraktionen eines Serumproteins* oder richtiger zwischen den in diesen Fraktionen jeweils vorherrschenden und ihre Charaktere bedingenden Eiweißkörpern *strukturchemische und nicht rein kolloidale Unterschiede* existieren [1]). Daß die *antikörperproduzierenden Zellen bei gleichzeitigem Angebot von zwei einander so nahestehenden Stoffen eine so bestimmte und sichere Wahl treffen, scheint uns für die Physiologie der Ernährung nicht ohne Bedeutung zu sein.*

Immunologisch fließt aus dem einseitigen Antagonismus zwischen Euglobulin und Albumin das Verständnis für viele, bisher unklare Beobachtungen und Angaben. Wenn das Kaninchen bei der Immunisierung mit Vollserum in der Regel nur Globulin-Antikörper produziert (*Michaelis* und *Oppenheimer*, *Doerr* und *Russ*, eigene Erfahrungen), wenn Meerschweinchen nach der subcutanen Injektion von Vollserum nur gegen Euglobulin anaphylaktisch werden (*Doerr* und *Russ*), oder wenn sich die Albuminüberempfindlichkeit bei ihnen erst nach ungewöhnlich langer Inkubation einstellt (*Dale* und *Hartley*), wenn man von Vollserum größere Mengen zur aktiven Sensibilisierung gegen Albumin braucht, als dem reinen im Vollserum enthaltenen Albumin entsprechen würde, so dürfen wir in solchen Erscheinungen eben nur den Ausdruck des Gesetzes sehen, daß die Zellen auf den Globulinreiz leichter und prompter ansprechen als auf Albumin, und daß sie im Stadium der Globulinreizung für Albumin absolut oder relativ unempfänglich sind.

Ob das Studium der Antigenkonkurrenz noch andere Erkenntnisse, speziell auch hinsichtlich des Mechanismus der Antikörperproduktion und ihrer Beziehungen zum allgemeinen Zellstoffwechsel vermitteln wird, sollen weitere Untersuchungen lehren.

---

[1]) Siehe jedoch die Erörterung über die Beziehungen der im Blutserum vorhandenen Sonderspezifitäten des Globulins und Albumins zu den Zustandsspezifitäten von *Obermayer* und *E. P. Pick* bei *Doerr* und *Berger*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1922.

Die Bedeutung der Blutversorgung für die Leistungsfähigkeit des Muskels.

Von

Edgar Atzler und **Robert Herbst.**

(Aus dem Physiologischen Laboratorium der deutschen Hochschule für Leibesübungen im Kaiser Wilhelm-Institut für Arbeitsphysiologie.)

(Eingegangen am 6. April 1922.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Der Einfluß der Blutversorgung auf die Arbeitsleistung des Muskels ist schon seit langer Zeit Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Bereits im Jahre 1667 erschienen unabhängig voneinander 2 Arbeiten von *Stenson* und *Swammerdam*, welche dieses Problem behandelten. Einem Tier wurde die Bauchaorta unterbunden, worauf sehr bald eine Paralyse der hinteren Extremität eintrat. Dieser nach *Stenson* benannte Versuch wurde oft wiederholt und modifiziert; da auch längere Zeit nach der Unterbindung die Contractilität der von der Blutzufuhr abgeschnittenen Muskelgruppen erhalten blieb, so neigte man dazu, die Anämie des Rückenmarks für die Paralyse verantwortlich zu machen. Erst als das gleiche Ergebnis bei Unterbindung der Art. brachialis bzw. cruralis, ja sogar bei durchschnittenen Nerven erzielt wurde, kam man allgemein zu der Überzeugung, daß die Absperrung der Blutzufuhr einen direkten Einfluß auf die Muskulatur ausüben müsse.

Durch die neueren Untersuchungen von *Fletcher*, *Hopkins*, *Verzar*, *v. Weizsäcker*, *Meyerhof* u. a. wissen wir, daß der eigentliche Arbeitsvorgang des Muskels unabhängig vom Sauerstoff erfolgt. In der Erholungspause spielt der Sauerstoff hingegen eine große Rolle; man glaubte zunächst, daß ihm die Aufgabe zufiele, die während des Arbeitsvorganges gebildete Milchsäure zu verbrennen.

Meyerhof sagt jedoch[1]), „daß in der Erholungsperiode sich eine eigentümlich gekoppelte Reaktion abspielt, bei der unter typischen Umständen auf 2 Moleküle verbrennende Milchsäure (= 1 Molekül Glucose) 6 weitere Moleküle Milchsäure zu Glykogen zurückverwandelt werden. Wenn also der Muskel soviel Erholungssauerstoff aufnimmt, als zur Verbrennung von 2 Molekülen Milchsäure hinreicht, verschwinden hierbei im ganzen 8 Moleküle."

[1]) Klin. Wochenschr. **1**, 230. 1922.

Die geschilderten Ergebnisse stützen sich auf Tierversuche. Untersuchungen am Menschen über das in Frage stehende Problem können aus naheliegenden Gründen nur insoweit angestellt werden, als es sich um den Einfluß der Blutversorgung auf die Muskelleistung handelt.

Mosso[1]) bahnte in seiner klassischen Arbeit über die Gesetze der Ermüdung den Weg für solche Untersuchungen; sein Mitarbeiter *Maggiora*[2]) veröffentlichte gleichzeitig eine Arbeit, in der er unter anderem über ergographische Versuche in Blutleere berichten konnte, Experimente, die auch *Mosso* in seiner oben erwähnten Arbeit kurz streift. Bei diesen Versuchen wurde die Art. brachialis während der Arbeit am Ergographen in nicht näher beschriebener Weise komprimiert. Dabei nahmen die Hubhöhen der Arbeitskurve immer mehr und mehr ab, bis sie die Nullinie erreichten. An der so gewonnenen Arbeitskurve fiel den Autoren besonders auf, daß die Kontraktionen nach Aufhören der Anämie rascher in die Höhe stiegen als sie vordem bei Hebung des gleichen Gewichts gefallen waren.

Ähnliche Untersuchungen über die Muskelleistung bei verminderter bzw. behinderter Blutzufuhr wurden von *Sjöberg*[3]) mitgeteilt; dieser Autor bediente sich eines stark modifizierten *Mosso*schen Ergographen, der sich vor allem dadurch von dem ursprünglichen Modell unterschied, daß keine Stützschraube, auf deren richtige Einstellung *Mosso* großen Wert legt, vorgesehen war. *Sjöberg* stellte einerseits Erschöpfungs-, andererseits Restitutionsversuche an. Bei den Erschöpfungsversuchen ließ er die Versuchsperson teils in Blutleere, teils in Stauung wechselnden Grades arbeiten. Die Arbeit begann entweder sofort nach Anlegung der Stauung bzw. der Blutleere oder in Abständen bis zu 5 Minuten nach erfolgter Abschnürung; bei Blutleere war es nun ziemlich gleichgültig, ob mit der Arbeit sofort oder erst 5 Minuten nach der Abschnürung begonnen wurde. Der Versuch, die zeitliche Distanz weiter auszudehnen, scheiterte an den dann auftretenden Parästhesien. Aus seinen Stauungsversuchen glaubt der Autor folgern zu können, daß das erzielte Arbeitsquantum mit steigendem Stauungsdruck sinkt.

Bei seinen Erholungsversuchen fand er, daß nach Freigabe der Zirkulation eine Ruhepause von 7 Minuten genügt, um einen Muskel, der in Blutleere bis zur vollständigen Kontraktionsunfähigkeit gearbeitet hat, wieder voll leistungsfähig zu machen. Die Versuche *Sjöbergs* sind aber offenbar in Überlastung ausgeführt; das geht sowohl aus der beigegebenen Abbildung des neuen Ergographen wie auch aus den Versuchsresultaten hervor. Nur im Überlastungsverfahren kann wohl der Fall eintreten, daß bei einem Stauungsdruck von nur 20 mm Hg und bei der geringen Belastung von 1 kg schon nach 100 Kontraktionen Arbeitsunfähigkeit eintritt; bei einigermaßen geübten Versuchspersonen müßte man den konstanten Abschnitt der Arbeitskurve erreichen, der dadurch charakterisiert ist, daß das Gewicht lange Zeit hindurch um den gleichen, relativ niedrigen Betrag gehoben werden kann. Gelingt dies nicht, so ist die Ursache weniger in einer Erschöpfung des Muskels, als in mechanischen Verhältnissen zu suchen.

Während der Arbeit am Ergographen nimmt nämlich die Spannung des Muskels zunächst stark und dann immer langsamer ab; sie erreicht sehr schnell einen Wert, bei dem im Überlastungsverfahren äußere Arbeit nicht mehr geleistet werden kann, weil die noch vorhandene Energie sich vollkommen in innerer Spannung erschöpft. Dieser Versuchsfehler wird sonst gewöhnlich dadurch ausgeschaltet, daß das zu hebende Gewicht nur dann unterstützt wird, wenn die Gelenkbänder des arbeitenden Fingers maximal gedehnt sind. Aus dieser Erörterung folgt aber,

[1]) Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 89. 1890.

[2]) Ebenda 191. 1890.

[3]) Skandinav. Arch. f. Physiol. 28, 23. 1913.

daß man aus einer im Überlastungsverfahren gewonnenen Kurve keine Rückschlüsse auf das Arbeitsquantum ziehen darf. In der *Sjöberg*schen Versuchsanordnung mag auch folgendes merkwürdige Ergebnis seine Erklärung finden; er erreicht nämlich bei einem Stauungsdruck von 40 und von 80 mm Hg bei Einsetzen der Arbeit sofort wie auch 3 Minuten nach Anlegung des Druckes jedesmal das gleiche Arbeitsquantum.

Die Aufgabe, die wir uns, einer Anregung von Herrn Geheimrat *Rubner* folgend, stellten, war es unter Vermeidung der gegen die *Sjöberg*sche Anordnung möglichen Einwände zu untersuchen, welche Veränderungen die Arbeitskurve durch eine Beschränkung oder völlige Behinderung der Blutzufuhr erleidet. Ferner wollten wir versuchen, aus den Beobachtungen allgemeine formale Folgerungen zu ziehen und die Ergebnisse mit den modernen Theorien der Muskeltätigkeit soweit in Einklang zu bringen, als dies zulässig erscheint.

Experimenteller Teil.

1. Allgemeine Technik.

Als Versuchspersonen dienten uns junge, kräftige Leute im Alter von 20—30 Jahren; sie zeichneten sich alle durch eine gut entwickelte Armmuskulatur (Ruderer!) aus.

Wir registrierten die Arbeit des linken Mittelfingers mit dem üblichen *Mosso*schen Ergographen bei einer Belastung von 2 kg. Den jeweiligen Stauungsdruck erzeugten wir durch eine um den Oberarm gelegte *Recklinghausen*sche Manschette, die durch eine Gasbombe aufgebläht wurde; die Druckhöhe wurde am Riva-Rocci-manometer abgelesen. Bei den Versuchen mit völliger Abschnürung verwendeten wir, wenn dies nicht in den Protokollen anders vermerkt ist, eine Druckhöhe von 180 mm Hg.

Die Kontraktionen erfolgten alle 2 Sekunden nach dem Takte eines Metronoms. Die Versuchsperson wurde stets erneut angewiesen, bei jedem Takte möglichst gleichmäßig und mit möglichster Kraft das Gewicht zu heben. Bei der Einstellung des Ergographen wurde mit besonderer Sorgfalt die Stellung der Stützschraube beachtet. Ehe der eigentliche Versuch begann, ließen wir die Versuchsperson stets 3—4 Kontraktionen am Apparat ausführen; auf diese Weise erreichten wir eine Dehnung des Fingers. Um die Versuche stets an der Grenze zwischen Überlastungs- und Belastungsverfahren durchzuführen, wurde die Stellung der Stützschraube so geregelt, daß das zu hebende Gewicht nur dann gestützt wurde, wenn die Gelenkbänder maximal gedehnt waren. So gelang es uns auch bei einem Stauungsdruck von 100—110 mm Hg nach dem anfänglichen Ermüdungsabfall die konstante Phase zu erreichen.

Um uns gegen den Einwand zu schützen, daß die erhaltenen Resultate durch zentrale Momente in unkontrollierbarer Weise beeinflußt seien, führten wir auch eine Versuchsreihe mit elektrischer Reizung durch. Hierzu benutzten wir ein Schlitteninduktorium mit *Wagner*schem Hammer, dessen primärer Stromkreis durch ein Metronom alle 2 Sekunden für die Dauer einer halben Sekunde geschlossen wurde. Die indifferente Elektrode wurde am Unterarm, die differente etwa in der Mitte des Oberarms auf der *Erb*schen Linie gut befestigt. Da die breite *Recklinghausen*sche Manschette neben der Elektrode keinen Platz fand, mußte bei diesen Versuchen mit einer schmalen elastischen Gummibinde gestaut werden. Für diese Kontrollversuche genügte es vollkommen, durch geringeres oder stärkeres Anziehen der Binde den Stauungsdruck zu variieren.

Bei den elektrischen Reizen war eine Belastung von 2 kg zu schwer; selbst bei einer eben noch erträglichen Reizstärke blieben die Ausschläge so klein, daß die einzelnen Hubhöhen auf der Kurve nicht untereinander verglichen werden konnten. Bei einer Belastung von 1400 g erhielten wir jedoch brauchbare Ausschläge; ein Rollenabstand von 5 cm lieferte fast maximale Reize.

Wir mußten uns also mit nicht maximalen Reizen begnügen; dann ist aber der Einwand möglich, daß unter unseren Versuchsbedingungen nicht die Arbeitsfähigkeit, sondern die Erregbarkeit des Muskels bzw. des Nerven vermindert war. Es sei aber gleich in diesem Zusammenhang bemerkt, daß uns bei diesen elektrischen Reizversuchen nur die Frage interessierte, ob die Kurven durch psychische Einflüsse entstellt sind. Da wir bei elektrischer Reizung prinzipiell die gleichen Resultate erzielten wie bei Willkürversuchen, so kommt dem obigen Einwand keine Bedeutung zu.

2. Das Verhalten der Arbeitskurve bei normaler, verringerter und völlig behinderter Blutversorgung.

Ehe wir auf die in diesem Abschnitte zu besprechenden Versuche eingehen, möchten wir allgemein die hämodynamischen Verhältnisse in einer gestauten Extremität besprechen. Steht die Manschette unter einem niedrigen Druck, so werden nur die Hautvenen verschlossen. Dadurch ist der Abfluß behindert, denn die tiefer zwischen den Muskeln gelegenen Venen können nicht den gesamten Abtransport des Blutes übernehmen. Der Druck in den Hautvenen wird also solange steigen, bis er den Stauungsdruck gerade überschreitet. Wählen wir einen höheren Stauungsdruck, der aber noch nicht den Blutdruck erreichen soll, so werden sämtliche Armvenen verschlossen. Da der Abfluß vollständig behindert, der Zufluß aber fast unverändert fortbesteht, so wird der Druck in dem gesamten abgeschlossenen Gefäßgebiet soweit steigen, bis er den Stauungsdruck überwindet. Die Folge der Abstauung ist eine Verringerung des Minutenvolums. Übertrifft der Manschettendruck den systolischen Blutdruck, so wird Zu- und Abfluß vollkommen unmöglich gemacht. Die Blutgefäße bleiben dabei gefüllt. Wir dürfen also streng genommen nicht von einer Blutleere sprechen; der Kürze halber erlauben wir uns in unseren Protokollen diese Ungenauigkeit.

Wir haben unsere Versuchspersonen auch in *Esmarch*scher Blutleere arbeiten lassen, wobei der Arm vorher in der bekannten Weise mit einer elastischen Gummibinde annähernd blutleer gewickelt wurde. Wir erhielten bei diesem Verfahren die gleichen Arbeitskurven wie bei einfachem Aufblähen der Armmanschette über den systolischen Druck. Wir gehen jetzt zur Schilderung der eigentlichen Versuche über; der Raumersparnis halber veröffentlichen wir unter den einzelnen Abschnitten nur ein Beispiel für viele analoge Versuche mit gleichem Ergebnis.

Wir besprechen zunächst die Versuche, welche wir bei einer Belastung von 2000 g unter normalen Zirkulationsverhältnissen (Versuch 1), unter einem Stauungsdruck von 80 mm Hg (Versuch 2) und in Blutleere

(Versuch 3) ausführten. Im letzten Falle wurde die Blutleere nach 3,5 Minuten aufgehoben[1]). Die Beobachtung erstreckte sich immer über einen Zeitraum von 12 Minuten.

Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt. Die in Stab 2, 3 und 4 verzeichneten Zahlen sind Hubhöhen in Zentimeter (siehe auch Abb. 1).

Tabelle I.

Zeit in Minuten	Versuch		
	I normale Verhältnisse	II Stauung 80 mm Hg	III Blutleere → norm. Verhält.
0	7,7	7,4	7,3
0,5	7,6	7,0	6,9
1,0	7,1	6,6	5,7
1,5	6,7	5,8	3,5
2,0	6,3	4,9	1,6
2,5	6,2	4,4	0,6
3,0	6,0	3,9	0,3
3,5	5,9	3,7	0,1
4,0	5,8	3,3	1,9
4,5	5,6	2,9	5,6
5,0	5,5	2,8	5,3
5,5	5,2	3,0	4,8
6,0	4,9	3,3	4,5
6,5	4,7	3,3	4,7
7,0	4,7	3,0	4,6
7,5	4,6	3,4	4,7
8,0	4,6	3,3	4,7
8,5	4,3	3,5	4,8
9,0	4,5	3,4	4,6
9,5	4,6	3,4	4,5
10,0	4,5	3,5	4,5
10,5	4,4	3,3	4,2
11,0	4,4	3,3	4,4
11,5	4,5	3,3	4,4
12,0	4,7	3,3	4,4

Versuch 1: Versuchsperson E. H., 5. I. 1922. Normale Verhältnisse, Belastung 2000 g, Versuchsdauer 12 Minuten.

Versuch 2: Versuchsperson E. H., 7. I. 1922. Stauung 80 mm Hg, Belastung 2000 g, Versuchsdauer 12 Minuten.

Versuch 3: Versuchsperson E. H., 10. I. 1922. Blutleere, Belastung 2000 g, Versuchsdauer 12 Minuten. Nach 3,5 Minuten Übergang in normale Verhältnisse (Strich).

Man ersieht sowohl aus Tabelle I wie aus Abb. 1, daß die in Stauung (80 mm Hg) geschriebene Kurve im Vergleich zu der unter normalen Verhältnissen gewonnenen eine steilere Senkung des Ermüdungsabfalles und eine geringere Höhe der konstanten Phase zeigt. Die in Blutleere

[1]) Die Aufhebung der Blutleere ist in den Tabellen durch einen wagerechten Strich gekennzeichnet.

geschriebene Kurve ist durch einen noch steileren Abfall bis zur Nulllinie charakterisiert, die sie unter unseren Versuchsbedingungen mit auffallender Regelmäßigkeit in etwa 3,5 Minuten erreichte.

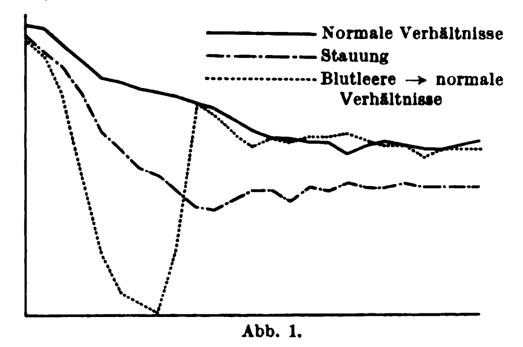


Abb. 1.

8. Die Veränderung der Arbeitskurve bei variiertem Stauungsdruck.

Die Versuchsanordnung unterscheidet sich von der im vorigen Abschnitt geschilderten nur insofern, als hier der Manschettendruck bei den einzelnen Versuchen verschieden hoch war. Das Nähere folgt aus den Tabellen II und III sowie aus Abb. 2.

Tabelle II.

Zeit in Minuten	Versuch			
	I normale Verhältnisse	IV Stauung 50 mm Hg	II Stauung 80 mm Hg	V Stauung 100 mm Hg
0	7,7	7,5	7,4	7,5
0,5	7,6	7,2	7,0	7,0
1,0	7,1	6,8	6,6	6,5
1,5	6,7	6,3	5,8	5,5
2,0	6,3	5,8	4,9	4,2
2,5	6,2	5,2	4,4	3,5
3,0	6,0	4,9	3,9	2,5
3,5	5,9	4,6	3,7	2,5
4,0	5,8	4,7	3,3	2,7
4,5	5,6	4,4	2,9	2,2
5,0	5,5	4,3	2,8	1,9
5,5	5,2	4,2	3,0	2,1
6,0	4,9	4,0	3,3	2,1
6,5	4,7	4,1	3,3	2,1
7,0	4,7	4,2	3,0	2,2
7,5	4,6	4,2	3,4	2,7
8,0	4,6	4,0	3,3	3,2
8,5	4,3	3,8	3,5	3,1
9,0	4,5	3,8	3,4	2,5
9,5	4,6	3,8	3,4	2,6
10,0	4,5	3,8	3,5	2,6
10,5	4,4	3,7	3,3	2,6
11,0	4,4	3,5	3,3	2,7
11,5	4,5	3,4	3,3	2,6
12,0	4,7	3,3	3,3	2,6

Versuch 4: Versuchsperson E. H., 6. I. 1922. Stauung 50 mm Hg, Belastung 2000 g, Versuchsdauer 12 Minuten.

Versuch 5: Versuchsperson E. H., 16. I. 1922. Stauung 100 mm Hg, Belastung 2000 g, Versuchsdauer 12 Minuten. Dazu in Vergleich gezogen: Versuch 1: Normale Verhältnisse; Versuch 2: Stauung 80 mm Hg.

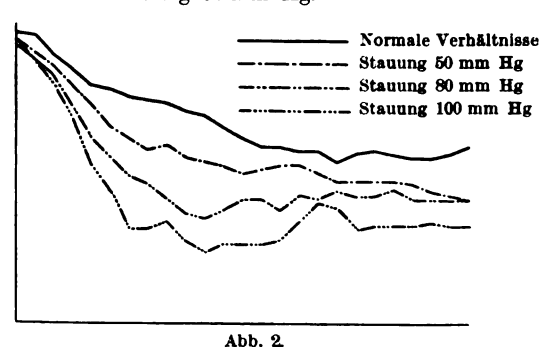


Abb. 2.

Tabelle III.

Zeit in Minuten	Versuch VI normale Verhältnisse	Versuch VII Stauung 60 mm Hg	Versuch VIII Stauung 80 mm Hg	Versuch IX Stauung 100 mm Hg
0	6,8	6,7	6,4	6,6
0,5	6,7	5,8	5,8	5,1
1,0	6,0	4,9	4,8	4,3
1,5	4,9	3,9	3,7	3,5
2,0	4,6	3,3	3,1	2,5
2,5	4,6	3,0	2,9	2,5
3,0	4,4	3,0	2,8	2,0
3,5	4,2	2,8	2,6	1,9
4,0	4,2	2,9	2,6	1,9
4,5	4,1	2,8	2,6	1,8
5,0	4,0	2,9	2,7	1,9
5,5	3,9	3,0	2,7	1,9
6,0	4,0	2,9	2,7	1,8
6,5	4,0	2,8	2,7	1,9
7,0	3,8	2,9	2,6	1,8
7,5	3,9	2,9	2,7	1,9
8,0	3,7	2,8	2,7	1,8
8.5	3,6	2,8	2,6	1,8
9,0	3,5	2,8	2,5	1,8
9,5	3,7	2,8	2,5	1,9
10,0	3,5	2,4	2,4	1,8
10,5	3,6	2,5	2,4	1,8
11,0	3,4	2.5	2,4	1,9
11,5	3,5	2,5	2,3	1,8
12,0	3,5	2,6	2,3	1,8

Versuch 6: Versuchsperson F., 13. III. 1922. Normale Verhältnisse, Belastung 2000 g, Versuchsdauer 12 Minuten.

Versuch 7: Versuchsperson F., 8. III. 1922. Stauung 60 mm Hg, Belastung 2000 g, Versuchsdauer 12 Minuten.

Versuch 8: Versuchsperson F., 9. III. 1922. Stauung 80 mm Hg, Belastung 2000 g, Versuchsdauer 12 Minuten.

Versuch 9: Versuchsperson F., 10. III. 1922. Stauung 100 mm Hg, Belastung 2000 g, Versuchsdauer 12 Minuten.

Wir ersehen aus dieser Zusammenstellung, daß die Leistungskurve mit steigendem Stauungsdruck um so rascher absinkt und daß die Hubhöhe in der konstanten Phase um so niedriger ist, je stärker gestaut wird.

4. Das Verhalten der Arbeitskurve nach Aufhebung der Abschnürung.

Schon *Maggiora*[1]) konnte bei seinen ergographischen Untersuchungen in Blutleere zeigen, daß nach Eintritt der Arbeitsunfähigkeit eine rasche Erholung einsetzt, wenn das arbeitende Glied wieder normal mit Blut versorgt wird. Die Hubhöhen wachsen hierbei rascher an als sie in Blutleere gefallen waren.

Tabelle IV.

Zeit in Minuten	Versuch I normale Verhältnisse	III Blutleere → normale Verhältnisse	IV Stauung 50 mm Hg	X Blutleere → Stauung 50 mm Hg	II Stauung 80 mm Hg	XI Blutleere → Stauung 80 mm Hg
0	7,7	7,3	7,5	7,5	7,4	7,4
0,5	7,6	6,9	7,2	7,0	7,0	7,0
1,0	7,1	5,7	6,8	6,7	6,6	6,1
1,5	6,7	3,5	6,3	6,0	5,8	4,1
2,0	6,3	1,6	5,8	4,4	4,9	2,9
2,5	6,2	0,6	5,2	3,0	4,4	2,0
3,0	6,0	0,3	4,9	0,7	3,9	0,7
3,5	5,9	0,1	4,6	0,1	3,7	0,1
4,0	5,8	1,9	4,7	2,6	3,3	1,0
4,5	5,6	5,6	4,4	3,6	2.9	3,1
5,0	5,5	5,3	4,3	3,3	2,8	2,6
5,5	5,2	4,8	4,2	3,5	3,0	2,0*)
6,0	4,9	4,5	4,0	4,0	3.3	2,2
6.5	4,7	4,7	4,1	4,1	3,3	3,0
7,0	4,7	4,6	4,2	3,9	3,0	2,9
7,5	4,6	4,7	4,2	4,0	3,4	2,0*)
8,0	4,6	4,7	4.0	4,0	3,3	2,3
8,5	4.3	4,8	3,8	4,0	3.5	3,4
9,0	4,5	4,6	3,8	4,1	3,4	3,4
9,5	4,6	4,5	3,8	4,1	3,4	3,0
10,0	4,5	4,5	3,8	4,1	3,5	3,3
10,5	4,4	4,2	3,7	4,0	3,3	3,4
11,0	4,4	4,4	3,5	3,9	3,3	3,5
11,5	4,5	4,4	3,4	3,9	3,3	3,4
12,0	4,7	4,4	3,3	4,1	3,3	3,4

*) Schwankungen, durch krampfartige Schmerzen bedingt, wie sie bei stärkerem Stauungsdruck häufig aufzutreten pflegen.

[1]) l. c.

Versuch 10: Versuchsperson E. H., 2. III. 1922. Blutleere → Stauung 50 mm Hg, Belastung 2000 g, Versuchsdauer 12 Minuten. Nach 3,5 Minuten Übergang in Stauung 50 mm Hg (Strich).

Versuch 11: Versuchsperson E. H., 12. I. 1922. Blutleere → Stauung 80 mm Hg, Belastung 2000 g, Versuchsdauer 12 Minuten. Nach 3,5 Minuten Übergang in Stauung 80 mm Hg (Strich). Dazu in Vergleich gezogen: Versuch 3: Blutleere → Normale Verhältnisse; Versuch 1: Normale Verhältnisse; Versuch 4: Stauung 50 mm Hg; Versuch 2: Stauung 80 mm Hg.

Uns interessierte nun die Frage, in welcher Weise die Kurve wieder ansteigt, wenn nach einer in Blutleere bis zur Kontraktionsunfähigkeit fortgesetzten Arbeit der Manschettendruck nur bis zu einem gewissen Stauungsdruck aufgehoben wurde (siehe Tabelle IV u. Abb. 3).

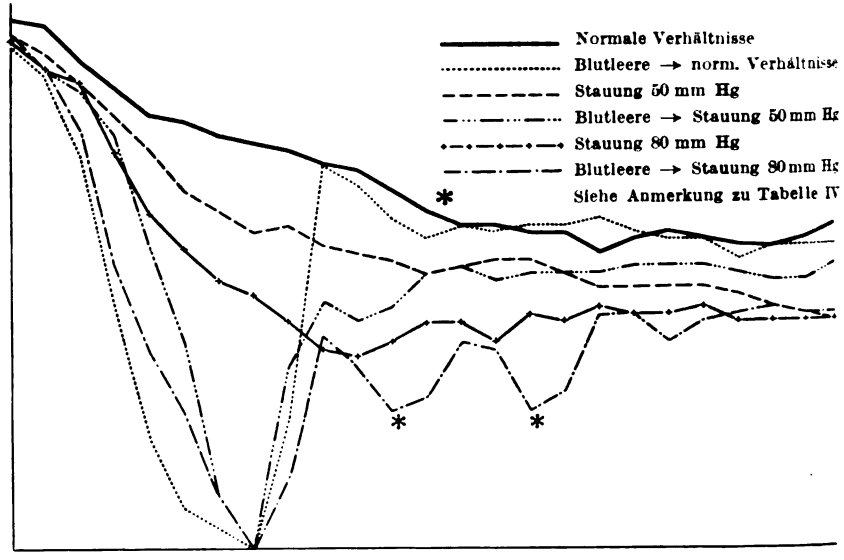


Abb. 3.

Löst man nach einer in Blutleere bis zur Kontraktionsunfähigkeit fortgesetzten Arbeit die Abschnürung, um in normale Zirkulationsverhältnisse oder in eine Stauung bestimmten Grades überzugehen, so erhält man folgende Ergebnisse.

Bei Übergang in normale Zirkulationsverhältnisse nehmen die Hubhöhen rasch zu und erreichen in kurzer Zeit eine Größe, die deutlich über derjenigen der konstanten Phase einer normalen Arbeitskurve gelegen ist. Aus Abb. 3 gewinnt man bei Betrachtung der punktiert gezeichneten Kurve sogar den Eindruck, daß die Kurve rasch bis zu einer solchen Höhe ansteigt, die sie nach gleichlanger Versuchszeit besessen hätte, wenn sie von Anfang an unter normalen Kreislaufbedingungen geschrieben worden wäre.

Geht man nach Aufhebung der Blutleere unmittelbar in eine Stauung von bestimmtem Druck über, so nehmen auch hier die Hubhöhen rasch zu; sie erreichen aber nie die Höhe der konstanten Phase einer normalen Arbeitskurve; die in Stauung erzielte konstante Phase ist durch eine um so geringere Hubhöhe ausgezeichnet, je höher der Stauungsdruck ist.

Beachtenswert ist in diesen Versuchen die Schnelligkeit des Anstiegs; meist erreichte die Kurve nach Aufhebung der Abschnürung mit 10—20 gleichmäßig an Höhe zunehmenden Kontraktionen (= 20—24 Sekunden) das Maximum der Erholungskurve.

5. Die Bedeutung der Pause zwischen Anlegung der Abschnürung und Arbeitsbeginn.

Sjöberg[1]) hatte bei seinen bereits obenerwähnten Erschöpfungsversuchen festzustellen gesucht, wie sich die Größe der Arbeitsleistung ändert, wenn die Arbeit sofort oder erst einige Minuten nach Abschnürung der Blutzufuhr aufgenommen wurde. Wegen der dabei aufgetretenen Parästhesien konnte er jedoch den Zeitraum zwischen Abschnürung und Arbeitsbeginn nur bis auf 5 Minuten ausdehnen. Wir nahmen seine Versuche wieder auf; die breite *Recklinghausen*sche Manschette gestattete es, die Pause zwischen Absperrung der Blutzufuhr und Arbeitsbeginn bis zu 30 Minuten auszudehnen (siehe Tabelle V und Abb. 4).

Tabelle V.

Zeit in Minuten	Versuch					
	III	XII	XIII	XIV	XV	XVI
0	7,3	6,5	6,9	6,6	2,6	0
0,5	6,8	6,0	6,4	5,9	0,8	0,4
1,0	5,7	5,3	4,6	4,5	0,1	5,8
1,5	3,5	3,8	2,9	2,0	5,7	5,7
2,0	1,6	2,6	1,4	0,3	5,5	5,8
2,5	0,6	1,4	0,3	5,3	5,3	5,8
3,0	0,3	0,5	3,9	4,8	5,0	5,7
3,5	0,1	0,1	3,8	4,0	5,0	5,3
4,0	1,9	3,0	3,4	4,1	4,7	5,2
4,5	5,6	4,0	3,7	4,2	4,7	4,7
5,0	5,3	4,4	3,8	4,2	4,5	4,6
5,5	4,8	4,2	4,1	4,4	4,2	4,8
6,0	4,5	4,2	4,1	4,2	4,2	4,8

Versuch 3: Versuchsperson E. H., 10. I. 1922. Blutleere → normale Verhältnisse (Strich), Belastung 2000 g, Versuchsdauer 12 Minuten, Arbeitsbeginn sofort nach Anlegung der Abschnürung.

Versuch 12: Versuchsperson E. H., 3. III. 1922. Blutleere → normale Verhältnisse (Strich), Belastung 2000 g, Versuchsdauer 6 Minuten, Arbeitsbeginn 5 Minuten nach Anlegung der Abschnürung.

[1]) l. c.

Versuch 13: Versuchsperson E. H., 4. III. 1922. Blutleere → normale Verhältnisse (Strich), Belastung 2000 g, Versuchsdauer 6 Minuten, Arbeitsbeginn 10 Minuten nach Anlegung der Abschnürung.

Versuch 14: Versuchsperson E. H., 6. III. 1922. Blutleere → normale Verhältnisse (Strich), Belastung 2000 g, Versuchsdauer 6 Minuten, Arbeitsbeginn 15 Minuten nach Anlegung der Abschnürung.

Versuch 15: Versuchsperson E. H., 7. III. 1922. Blutleere → normale Verhältnisse (Strich), Belastung 2000 g, Versuchsdauer 6 Minuten, Arbeitsbeginn 20 Minuten nach Anlegung der Abschnürung.

Versuch 16: Versuchsperson E. H., 14. III. 1922. Blutleere → normale Verhältnisse, Belastung 2000 g, Versuchsdauer 6 Minuten, Arbeitsbeginn 25 Minuten nach Anlegung der Abschnürung.

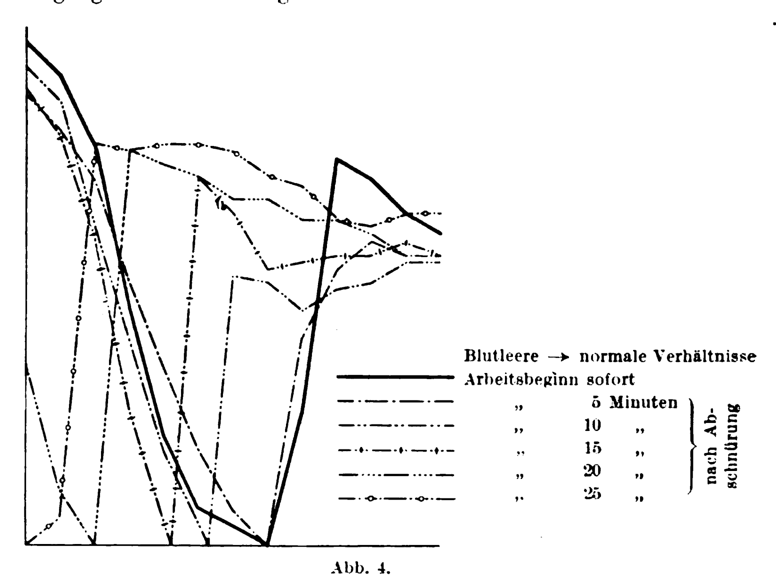


Abb. 4.

Versuch 12, bei dem mit der Arbeit 5 Minuten nach Anlegen der Blutleere begonnen wurde, zeigt im absteigenden Teile der Kurve keine wesentliche Abweichung von dem Kurvenbilde des Versuchs 3, bei dem die Arbeit sofort nach der Abschnürung einstzte. Aber schon Versuch 13 mit 10 Minuten Zwischenzeit bietet ein anderes Bild; die Kurve sinkt steiler ab und erreicht fast 1 Minute eher den Punkt der Kontraktionsunfähigkeit. Versuch 14 mit 15 Minuten Wartezeit zeigt einen noch steileren Abfall und die Nullinie wird noch rascher erreicht. Bei Versuch 15 tritt eine neue Erscheinung auf; während bei den bisher besprochenen Versuchen in Blutleere die anfängliche Hubhöhe immer ungefähr den gleichen Betrag erreicht wie unter normalen Zirkulationsbedingungen, sehen wir hier bei einer Wartezeit von 20 Minuten eine beträchtlich niedrigere Anfangshubhöhe; auch erfolgte hier die Kontraktionsunfähigkeit schon nach 1 Minute. Dehnt man die Wartezeit

auf 25 Minuten aus — Versuch 16 —, so vermag sich der Muskel überhaupt nicht mehr zu kontrahieren.

Je größer also der Zwischenraum zwischen Anlegung der Abschnürung und Arbeitsbeginn ist, desto steiler wird der Ermüdungsabfall und um so eher wird der Moment der Kontraktionsunfähigkeit erreicht. Wird der Zeitraum bis zum Arbeitsbeginn bei einem Druck von 180 mm Hg auf über 15 Minuten verlängert, so vermindert sich rasch die Anfangshöhe der Kurve. Nach einer Wartezeit von 25 Minuten kann man überhaupt keine Arbeitsleistung mehr erzielen.

Sobald die Abschnürung aufgehoben wird, steigen die Kurven steil an; doch zeigen sie in der Höhe, die ihr Wiederanstieg erreicht, Unregelmäßigkeiten; meist kehren sie nur unter Schwankungen und erst nach längerer Zeit zu der Höhe zurück, die nach den in Abschnitt 4 geschilderten Erfahrungen zu erwarten ist.

Bei diesen Versuchen liegt der Gedanke nahe, daß der durch die komprimierende Armmanschette auf die Nerven ausgeübte Druck das Bild unserer Arbeitskurven beeinträchtigt. Dafür sprechen die ständig zunehmenden Parästhesien und das Erlöschen der Druckempfindlichkeit. Nach *Wedensky*[1]) rufen mechanische, chemische, thermische und elektrische Reize einen eigentümlichen Erregungszustand hervor, den dieser Autor als Parabiose bezeichnet. Hierbei erleidet die betroffene Nervenstrecke verschiedene Veränderungen und verliert allmählich die Leitungsfähigkeit in ihrer sensiblen und motorischen Bahn. Um den Einfluß des Nervendruckes auf die Arbeitsfähigkeit der abhängigen Muskelpartien zu untersuchen, erzeugten wir die Blutleere mit Druckwerten, die verschieden hoch über dem systolischen Blutdruck der Versuchsperson lagen, z. B. 140, 160, 180 und 200 mm Hg. Darauf wurde die Zeit bestimmt, die verfloß, bis Arbeitsunfähigkeit eintrat. Die Kontraktionen durften aber natürlich nur in größeren Zeitabständen — alle 5 Minuten eine Kontraktion — ausgeführt werden, denn es mußte verhindert werden, daß sich Stoffwechselprodukte anhäufen, von denen wir wissen, daß sie die Arbeitsfähigkeit des Muskels beeinträchtigen (siehe Tabelle VI).

Tabelle VI.

Zeit nach Abschnürung in Minuten	Versuch			
	XVII 140 mm Hg	XVIII 160 mm Hg	XIX 180 mm Hg	XX 200 mm Hg
0	6,3	6.6	6,6	6,9
5	6,3	6,6	6,6	6,9
10	6,2	6.5	6,4	6,7
15	6,0	6.3	1,8	1,3
20	4,8	1.9	1.1	—
25	2,0	0,8	—	—
30	—	—	—	—

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **100**, 1. 1903.

Versuch 17: Versuchsperson R. H., 6. III. 1922. Blutleere: Druck 140 mm Hg, Belastung 2000 g.

Versuch 18: Versuchsperson R. H., 4. III. 1922. Blutleere: Druck 160 mm Hg, Belastung 2000 g.

Versuch 19: Versuchsperson R. H., 4. III. 1922. Blutleere: Druck 180 mm Hg, Belastung 2000 g.

Versuch 20: Versuchsperson R. H., 4. III. 1922. Blutleere: Druck 200 mm Hg, Belastung 2000 g.

Die Tabelle zeigt uns deutlich, daß die Arbeitsfähigkeit um so rascher nachläßt, je höher wir den Manschettendruck steigern. Ein solches Verhalten kann wohl nur auf den Nervendruck bezogen werden.

Nach Aufhebung der Blutleere steigt die Arbeitskurve unter starken Unregelmäßigkeiten an; das wird auf psychischen Momenten beruhen. Wird nämlich nach einer länger dauernden Blutleere die Manschette entfernt, so steigern sich beim Wiedereinströmen des Blutes die Parästhesien ins Unerträgliche; das muß aber das Bild der Arbeitskurve wesentlich beeinflussen.

6. Versuche mit elektrischer Reizung.

Gegen ergographische Untersuchungen wird häufig der Einwand erhoben, daß die psychische Komponente nicht genügend berücksichtigt wird. Wir haben deshalb die sämtlichen bisher beschriebenen Versuche mit elektrischer Reizung wiederholt.

Tabelle VII.

Zeit in Minuten	Versuch XXI normale Verhältnisse	Versuch XXII Stauung	Versuch XXIII Blutleere
0	7,3	6,8	7,6
0.5	6,2	6,2	6,9
1.0	4,6	5,0	4,9
1,5	3,6	1,7	2,0
2,0	1,8	0,9	0,6
2,5	1,7	0,6	0,2
3,0	1,5	0,8	—
3,5	1,5	1,0	—
4,0	1,6	1,0	—
4,5	1.6	1,0	—
5,0	1.4	1,0	—
5,5	1,7	1,0	—
6,0	1,7	1,0	—
6.5	1,7	1,0	—
7,0	1.6	0.8	—
7,5	2,0	0.9	—
8,0	1,5	0.9	—

Versuch 21: Versuchsperson E. H., 17. II. 1922. Normale Verhältnisse, Belastung 1400 g, Rollenabstand 5,0 cm, Versuchsdauer 8 Minuten.

Versuch 22: Versuchsperson E. H., 27. II. 1922. Stauung, Belastung 1400 g, Rollenabstand 5,0 cm, Versuchsdauer 8 Minuten.

Versuch 23: Versuchsperson E. H., 20. II. 1922. Blutleere, Belastung 1400 g, Rollenabstand 5,0 cm, Versuchsdauer 3 Minuten.

Auch hier finden wir bei Vergleich der in Stauung gewonnenen Kurve mit der unter normalen Zirkulationsverhältnissen erhaltenen eine geringere Höhe der konstanten Phase und bei Blutleere ein rasches Absinken der Kurve bis zur Kontraktionsunfähigkeit.

Tabelle VIII.

Zeit in Minuten	Versuch XXI normale Verhältnisse	Versuch XXIV Blutleere → norm. Verhält.
0	7,3	3,3
0,5	6,2	2,3
1,0	4,6	0,7
1,5	3,6	0,1
2,0	1,8	2,5 *
2,5	1,7	1,4
3,0	1,5	0.9
3,5	1,5	0,5
4,0	1,6	0,4
4.5	1,6	0,3
5,0	1,4	0,2
5,5	1,7	0
6,0	1,7	0,9
6,5	1,7	1,7
7,0	1,6	1,5
7,5	2,0	1,6
8,0	1.5	1,4

Versuch 24: Versuchsperson E. H., 20. I. 1922. Blutleere → normale Verhältnisse, Belastung 1400 g, Versuchsdauer 8 Minuten, Rollenabstand 5,7 cm, nach $1^{3}/_{4}$ Minuten Verringerung auf 5,0 cm (Sternchen). Nach 6 Minuten Übergang in normale Verhältnisse (Strich). In Vergleich gezogen: Versuch 21: normale Verhältnisse.

Die in Tabelle VIII niedergelegten Versuche bestätigen die unter 4. mitgeteilten Ergebnisse. Auch bei elektrischer Reizung kehrt die Arbeitskurve mit guter Annäherung zu der Höhe der unter normalen Kreislaufverhältnissen erreichten konstanten Phase zurück.

Um den Einfluß des Nervendrucks auf die Arbeitsfähigkeit des Muskels mit elektrischen Reizen nachzuprüfen, wurden ähnliche Versuche unternommen, wie sie unter Abschnitt 5 mitgeteilt worden sind. Nach *Wedensky* muß bei einer Reizung oberhalb der Abschnürung nach einiger Zeit Kontraktionsunfähigkeit eintreten; denn die vom Druck getroffene Nervenstrecke büßt allmählich ihr Leitungsvermögen ein. Bei Reizung unterhalb der Abschnürung muß dagegen eine beträchtlich längere Zeit hindurch eine Arbeitsleistung erzielt werden können. Wir

führten Versuche mit möglichst seltenen Reizen — alle 5 Minuten — aus, wobei wir einmal oberhalb, das andere Mal unterhalb der Elektrode abschnürten. Die Versuche mußten jedoch nach kurzer Zeit abgebrochen werden, da bei der notwendigerweise zu verwendenden schmalen Binde die Parästhesien sich ins Unerträgliche steigerten, ehe deutliche Unterschiede beobachtet werden konnten.

II. Theoretischer Teil.

Nach der heute geltenden Anschauung über die Muskeltätigkeit wird die Leistungsfähigkeit beeinträchtigt, wenn sich Stoffwechselschlacken im Muskelgewebe über ein gewisses Maß anreichern. Unter normalen Verhältnissen werden sie durch den Blutstrom zum Teil weggeführt, zum Teil durch oxydative Vorgänge zu neuem Brennmaterial aufgebaut (Resynthese). Unterbrechen wir die Blutzufuhr vollständig — wie in unseren Blutleereversuchen — oder verringern wir das Minutenvolum — wie in unseren Stauungsversuchen —, so wird die Beseitigung der Stoffwechselendprodukte erschwert und die Resynthese beeinträchtigt. Man darf ja wohl vermuten, daß bei der Arbeit die kontraktionshemmenden Dissimilationsprodukte dem jeweiligen Gefälle entsprechend in die Lymph- und Blutflüssigkeit diffundieren. Umgekehrt tritt der Sauerstoff aus dem Blutstrom in die Gewebe über, um dort mit gewissen Stoffwechselprodukten in Reaktion zu treten[1]).

Werden nun mit Beginn der Arbeit im Muskel Stoffwechselschlacken gebildet, so können sie je nach dem Gefälle verschieden schnell unschädlich gemacht werden. Wir sahen aber in den unter Abschnitt 2 geschilderten Versuchen, daß auch in völliger Blutleere noch eine bestimmte Arbeit geleistet werden kann. Die Dissimilationsprodukte können sich also bis zu einem gewissen Grade anhäufen und trotzdem kann der Muskel weiter arbeiten. Berücksichtigt man nun weiter den Abfall einer in Blutleere gewonnenen Arbeitskurve, so liegt der Schluß nahe, daß einer bestimmten Arbeitsleistung eine ganz bestimmte Konzentration der gebildeten Stoffwechselprodukte entspricht. Die Arbeitsleistung wäre dann eine symbate Funktion der Differenz zwischen der augenblicklich herrschenden und der maximalen[2]) Konzentration an kontraktionshemmenden Stoffen.

Diese Hypothese ermöglicht uns ein gewisses Verständnis des Bildes der gewöhnlichen Arbeitskurve. Diese ist dadurch charakterisiert, daß die Hubhöhen mit der Dauer des Versuchs langsam an Höhe ab-

[1]) Man denkt heutzutage hierbei besonders an die Milchsäure.

[2]) Unter maximaler Konzentration verstehen wir nicht den möglichen Maximalwert, bis zu dem sich die kontraktionshemmenden Stoffe im Muskel anhäufen können, sondern den Grenzwert der Konzentration, bei dem unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine weitere Arbeitsleistung unmöglich wird.

nehmen, um einem gleichbleibenden, relativ niederen Wert zuzustreben; für diesen Abschnitt hat sich der Name konstante Phase eingebürgert. Zu Beginn der Arbeit sind noch keine kontraktionshemmenden Stoffe vorhanden, der Muskel kann also maximale Arbeit leisten; mit jeder folgenden Kontraktion entstehen aber Stoffwechselschlacken, die ein immer weiteres Absinken der Hubhöhen bewirken. Ein Teil dieser Schlacken wird zwar in der Ruhezeit zwischen den Kontraktionen beseitigt; solange wir uns in dem abfallenden Teil der Kurve befinden, übertrifft die Menge der neugebildeten Dissimilationsprodukte den Betrag an fortgeführten Stoffen. Werden aber bei der jetzt verminderten Arbeitsleistung nur so viel Endprodukte gebildet, als in der Pause zwischen den Kontraktionen wieder entfernt werden können, so haben wir einen Gleichgewichtszustand erreicht, der in der konstanten Phase der Arbeitskurve seinen Ausdruck findet.

Verringern wir durch Stauung das Minutenvolumen, so erniedrigen wir auch das Diffusionsgefälle; die kontraktionshemmenden Stoffe häufen sich um so stärker an, je mehr das Minutenvolumen durch den Stauungsdruck herabgesetzt wurde. Daraus erklärt sich aber ohne weiteres der in Abschnitt 3 erhobene Befund, daß die Leistungskurve mit steigendem Stauungsdruck immer rascher absinkt. Auch die Beobachtung, daß die Hubhöhe der konstanten Phase um so niedriger ist, je größer der Stauungsdruck ist, unter dem gearbeitet wird, läßt sich mit der Hypothese in Einklang bringen. Dem geringeren Diffusionsgefälle entsprechend können nämlich weniger Dissimilationsprodukte entfernt werden und aus diesem Grunde stellt sich das Gleichgewicht auf einen niedrigeren Stand ein.

Bei der Arbeit in Blutleere können die Stoffwechselendprodukte nicht mit dem Blut- und Lymphstrom fortgespült werden; auch die oben erwähnte Resynthese kann nicht einsetzen, da die Sauerstoffversorgung eingestellt ist; die Dissimilationsprodukte diffundieren also nach den Diffusionsgesetzen in den stagnierenden Blut- und Lymphraum. Da das Gefälle rasch abnimmt, erreicht die Konzentration der Stoffwechselprodukte in kurzer Zeit ihren Maximalwert[1]), bei dem nach der obigen Beziehung die mögliche Arbeit Null wird.

Wird nun die Blutzirkulation wieder in Gang gebracht, so sehen wir, daß die Kurve rasch eine solche Höhe erstrebt, die ungefähr der konstanten Phase einer Arbeitskurve entspricht, die bei normaler Blutzirkulation zu erwarten gewesen wäre (Abschnitt 4). Dieser experimentelle Befund dürfte in folgender Weise zu deuten sein. Im letzten Stadium der Blutleere haben sich die kontraktionshemmenden Stoffe in einer solchen Konzentration angehäuft, daß äußere Arbeit nicht mehr geleistet werden kann. Läßt man nun wieder das Blut in normaler Weise kreisen,

[1]) Siehe Anmerkung S. 13.

so werden die Dissimilationsprodukte rascher weggespült, als sie bei den allmählich an Größe zunehmenden Kontraktionen neu gebildet werden. Die Arbeitskurve erreicht bald einen Gleichgewichtszustand, dessen Höhe bestimmt ist durch die Größe des Minutenvolums des Blutstromes. Sobald genau so viel weggeführt wird, als bei jeder Kontraktion neu entsteht, befinden wir uns im konstanten Teil der Arbeitskurve. Da nach unserer Annahme jetzt das Minutenvolum genau so groß ist wie unter normalen Zirkulationsbedingungen, so ist es verständlich, daß auch die Höhe der konstanten Phase die gleiche Größe hat wie bei einer Arbeitskurve unter durchaus normalen Zirkulationsbedingungen.

Wichtig scheint uns der Umstand zu sein, daß der Muskel die Fähigkeit besitzt, sich nach Blutleere so weit zu erholen, daß er normale Hubhöhe leisten kann. Häufen sich also zuviel Dissimilationsprodukte an, so ist eine Vorkehrung getroffen, um dieses Zuviel rasch wieder zu beseitigen. Diese Verhältnisse kommen auch bei der normalen Arbeitskurve in Frage, wenn das Gewicht für die betreffende Versuchsperson zu schwer ist. Man erhält dann in der konstanten Phase an Stelle des sonst gleichmäßigen Verlaufs die nach *Lombard* benannten Wellen. Hier häufen sich in einem gewissen Rhythmus, äußerlich zum Ausdruck gebracht durch entsprechende Arbeitsverminderung, Dissimilationsprodukte an, die dann unter gleichzeitig steigender Arbeitsleistung wieder fortgeführt werden. Darauf tritt eine erneute Anhäufung und Arbeitsverminderung ein usw.

Unsere Versuche scheinen nun zum Teil dafür zu sprechen, daß nach Aufhebung der Blutleere die Arbeitskurve nicht der konstanten Phase zustrebt, sondern über diesen Wert beträchtlich hinausschießt. Es sieht so aus, als ob sie eine derartige Höhe erreicht, die sie nach gleichlanger Versuchszeit besessen hätte, wenn sie von Anfang an bei ungestörter Zirkulation geschrieben worden wäre. Dieses Verhalten ist offenbar auf die reaktive Hyperämie zurückzuführen. Nach Aufhebung der Blutleere färbt sich der Arm krebsrot. Das Minutenvolum ist gegenüber normalen Verhältnissen vermehrt; infolgedessen können in der Zeiteinheit mehr Dissimilationsprodukte als unter gewöhnlichen Zirkulationsbedingungen beseitigt werden. Daraus folgt, daß die Hubhöhen über der konstanten Phase der gewöhnlichen Arbeitskurve liegen müssen. Verschwindet die reaktive Hyperämie, so nähern wir uns wieder den ursprünglichen Kreislaufverhältnissen und erreichen damit die Hubhöhe der konstanten Phase.

Gehen wir nach Arbeit in Blutleere in eine Stauung bestimmten Druckes über, so sehen wir die Leistungskurve der Höhe der konstanten Phase zustreben, welche eine unter diesem Stauungsdruck geschriebene Arbeitskurve aufweist. Nach Aufhebung der Blutleere wird wegen des bestehenden Stauungsdruckes nur einem Blutstrom von geringerem

Minutenvolum als unter normalen Verhältnissen der Durchfluß gestattet. Es kann demnach nur eine geringere Menge der angehäuften Dissimilationsprodukte wieder entfernt werden und deshalb muß sich die Arbeitsleistung auf eine niedrigere Höhe einstellen. Die Kurve erreicht also ihr Gleichgewicht bei der Hubhöhe, die dem neuerlich durch die Gefäße strömenden Minutenvolum entspricht.

Zusammenfassung.

1. In Stauung wird der Ermüdungsabfall steiler und die Höhe der konstanten Phase der Arbeitskurve niedriger.

2. In Blutleere wird der Ermüdungsabfall steiler als in Stauung und es kommt in kurzer Zeit zur Kontraktionsunfähigkeit.

3. In Stauung ändert sich die Steilheit des Ermüdungsabfalls und die Höhe der konstanten Phase in einem bestimmten Verhältnis mit dem Stauungsdruck. Je höher der Stauungsdruck, d. h. je geringer das Minutenvolum des Blutstroms, desto steiler der Ermüdungsabfall und desto niedriger die konstante Phase.

4. Wird nach Erreichung der Kontraktionsunfähigkeit in Blutleere die Blutabsperrung wieder aufgehoben, so tritt eine sehr rasche Wiederkehr der Arbeitsfähigkeit ein, und zwar bis zu der Zuckungshöhe, welche dem nunmehr durch die Gefäße fließenden Minutenvolum entspricht.

5. Wird die Arbeit erst einige Zeit nach Anlegung der Blutleere begonnen, so wird der Ermüdungsabfall um so steiler und die Kontraktionsunfähigkeit um so eher erreicht, je größer die Zwischenzeit zwischen dem Anlegen der Abschnürung und dem Arbeitsbeginn ist. Bei einem Druck von 180 mm Hg in der *Recklinghausen*schen Manschette ist nach 25 Minuten Zwischenzeit gar keine Arbeit mehr möglich.

6. Der Eintritt der Arbeitsunfähigkeit bei längerer Zwischenzeit zwischen dem Anlegen der Abschnürung und dem Arbeitsbeginn ist von dem verwendeten Druck abhängig (allmählicher Verlust der Leitungsfähigkeit des gepreßten Nerven).

7. Dieselben Resultate wurden bei elektrischer Reizung erhalten.

Über hämolytische und koagulierende Wirkung der Metallionen.

Von

E. Meneghetti.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Kgl. Universität zu Padua.)

(Eingegangen am 8. April 1922.)

Mit 9 Abbildungen im Text.

1. Einleitung.

In früher schon veröffentlichten Untersuchungen[1]) habe ich die Metalle in ihren hämolytischen und koagulierenden Eigenschaften vergleichend untersucht. Es ging aus jenen Arbeiten hervor, daß die untersuchten Metallsalze (Zn, Cd, Fe, Ca, Ni, Pb, Cu, Hg, Ag, Pd, Pt, Au) eine den Kationen zugrunde liegende Wirkung, die bei verschiedenen Konzentrationen und bei verschiedener Tätigkeit derselben verschieden ist, auf die roten Blutkörperchen ausübten. Ganz niedrige Konzentrationen verursachen Hämolyse, höhere dagegen Koagulation.

Die Metalle weisen sowohl in der hämolytischen wie in der koagulierenden Wirkung Verschiedenheiten auf, je nach der Stelle, die sie in der elektrischen Spannungsreihe einnehmen; und es ist im allgemeinen die Behauptung erlaubt, daß sie um so wirksamer sind, je niedriger ihre Lösungstension ist.

Ich beabsichtige nun mit den Versuchen, die ich hier anführen werde, die Nachforschungen der schon erwähnten Arbeiten vollständig zu ergänzen und, während ich früher hauptsächlich die Hämolyse behandelte, jetzt mit größerer Ausführlichkeit die Koagulation ins Auge zu fassen, da diese, wie bekannt, mit dem Prozesse der histologischen Fixierung in Verbindung tritt; außerdem möchte ich die Konzentrationen, die einen Zwischenwert besitzen, die nämlich weder ausgesprochen hämolytisch noch ausgesprochen koagulierend wirken, behandeln, deren Studium besondere Wichtigkeit zur Erklärung dieser Phänomene in ihrem ersten Auftreten und in der weiteren Ausbildung besitzt.

---

[1]) *E. Meneghetti*, Arch. di scienze biol. **2**, 285. 1921.

2. Technik.

Die angewandte Technik war im allgemeinen der von mir in der erwähnten Arbeit besprochenen gleich; ich will sie daher nur kurz zusammengefaßt wiedergeben.

Man benutzte rote Blutkörperchen von Kaninchen; den Tieren, die bloß zu einem Versuche gebraucht wurden, wurde von der Halsvene Blut abgezapft. Die roten Blutkörperchen wurden 5 mal auf der Zentrifuge gewaschen, das erstemal mit einer isotonischen NaCl-Lösung, später mit isotonischen NaCl- oder Na_2SO_4- oder KNO_3-Lösungen, je nach dem es experimentell erforderlich war.

Für das Kaninchenserum gibt die Literatur schwankende Werte von Δ = 0,57 [1]) bis 0,59 [2]) an, vielleicht in bezug auf verschiedene Rassen und auf verschiedenes Klima. Bei Annahme des Mittelwertes habe ich immer Waschlösungen mit einem Δ = 0,58 gebraucht und die entsprechenden Konzentrationen durch Interpolation der Literaturangaben[3]) erhalten. Nachdem ich auf diese Weise die Aufschwemmung der Blutkörperchen erhalten hatte, wurden diese mit dem Thoma-Zeiss gründlich nachgezählt. Die zu untersuchenden Metallsalze wurden entweder direkt präpariert oder durch wiederholtes Krystallisieren gereinigt. Gewöhnlich bereitete ich sofort eine Metallsalzlösung mit Δ = 0,58. In manchen Fällen war dies jedoch nicht möglich, und es wurde eine Mischlösung von NaCl und dem Salze, mit dem experimentiert werden sollte, bereitet, und zwar in der Weise, daß Δ immer den Wert 0,58 behielt. Die notwendigen Konzentrationen erreichte ich entweder durch Interpolation der Literaturangaben, oder durch direkte Bestimmung des Gefrierpunktes. Von dieser ersten Lösung ausgehend erhielt ich durch darauffolgende Verdünnungen mit derselben isotonischen Lösung, die zur Waschung der Blutkörperchen gebraucht wurde, eine Reihe von isotonischen Lösungen des Metallsalzes mit fortschreitend höheren Konzentrationen. Das für jede Lösung benutzte Volumen betrug 10 ccm; man bediente sich gewöhnlicher Probegläschen. Jedem Probegläschen wurde mit einer Präzisionspipette 0,2 ccm Blutkörperchensuspension zugegeben, darauf wurde fest geschüttelt und zugepfropft. Alle Probegläschen — man gab auch Kontrollprobegläschen dazu — wurden im Thermostat auf 20° gesetzt und nach 24 Stunden wurde nachgeschaut, ob Hämolyse eingetreten war, wobei man auch spektroskopische Betrachtungen anstellte. Der Niederschlag in den Probegläschen wurde, wenn ein solcher vorhanden war, mikroskopisch untersucht, das flüssige dekantiert und mit destilliertem Wasser ersetzt und dabei untersucht, ob irreversible Koagulation da war.

Als Index der hämolysierenden Tätigkeit eines Salzes habe ich die Minimalmenge, die noch Hämolyse gibt in Gramm-Äqu. für je ein Blutkörperchen, angenommen und als Index der koagulierenden Tätigkeit die Minimalmenge, die, ohne die geringste Spur von Hämolyse zu geben, durch Zusatz von destilliertem Wasser irreversible Koagulation gibt.

Die Ursachen und die Untersuchungen, auf Grund welcher ich es für gerechtfertigt und notwendig hielt, solche Globularwerte zu bestimmen, wurden auch in der erwähnten Arbeit vorgebracht.

Bei den Untersuchungen, die ich jetzt vorbringen werde, war die angewandte Technik wie schon erwähnt, die gleiche; sie wurden jedoch nicht bei Thermostattemperatur, sondern bei gewöhnlicher Zimmer-

---

[1]) *G. Moruzzi*, Arch. di Fisiol. **5**, 185. 1908.

[2]) *F. Bottazzi*, Ergebn. d. Physiol. **8**, 287. 1908.

[3]) *Landolt-Börnstein*, Physikalisch-chemische Tabellen. 4. Aufl. S. 801. Berlin 1912.

temperatur (zwischen 10—16°) angestellt, um, soweit es möglich war, auch die Zeit des Erscheinens der Hämolyse feststellen und die Koagulation in ihrer Bildung studieren zu können. Und während ich in den früheren Versuchen getrachtet habe, die Salze in möglichst gutem Dissoziationszustande zu erhalten, habe ich jetzt in vielen Versuchen die Zurückdrängung der elektrolytischen Dissoziation zu erreichen gesucht. Dies alles wird aus folgendem klar hervorgehen.

3. Hämolyse.

a) Erwägungen im allgemeinen.

Wenn man bedenkt, daß die untersuchten Salze aus einer Base und einer starken Säure bestehen, so wird man im allgemeinen in der Lösung $MA \rightleftarrows M^{\cdot} + A'$ und für die hydrolytische Dissoziation $M^{\cdot} + A' + H^{\cdot} + OH' \rightleftarrows MOH + H^{\cdot} + A'$ haben, und die Hämolyse entweder dem ungespaltenen Molekül oder den Produkten der elektrolytischen Dissoziation zuschreiben.

Auf Grund von Versuchen, Ausrechnungen und Vergleichungen in der erwähnten Arbeit habe ich die Bildung der Hämolyse durch das Hydrat des Metalls und durch die sich aus der hydrolytischen Dissoziation gebildete Säure ausgeschlossen. Infolge anderer, verschiedener Erwägungen nahm ich an, daß das ungespaltene Molekül nicht das Agens der Hämolyse sei. Man bedenke auch, daß bei äußerst niedrigen Konzentrationen, welche Hämolyse bewirken, die elektrolytische Dissoziation für einige Salze als vollkommen angenommen werden kann. In einem Versuche habe ich die Hämolyse mit $AgNO_3$ bei einer Konzentration von $155 \cdot 10^{-9}$ g Äqu. pro Liter bemerkt. In einem anderen Versuche erschien die Hämolyse nach früher stattgefundener Verminderung der Zahl der roten Blutkörperchen, die untersucht wurden, bei einer $AgNO_3$-Konzentration von $86{,}5 \cdot 10^{-9}$ g Äqu. pro Liter. Und bei Anwendung einer noch geringeren Anzahl von Blutkörperchen würde man sicherlich bei noch dünneren Konzentrationen die Hämolyse erhalten. Denn bekanntlich[1]) beträgt ja die elektrolytische Dissoziation für $AgNO_3$ in $^n/_{10}$-Lösung $\alpha = 0{,}86$; und da dieser Wert bei wachsender Verdünnung zunimmt, liegt es klar auf der Hand, daß bei allen obenerwähnten sehr kleinen Konzentrationen die Dissoziation als vollkommen erachtet werden könne. Ein direkter Beweis, daß die Kationen die Erreger der Hämolyse sind, wird von der Tatsache geliefert, daß die hämolytische Tätigkeit parallel mit der Ionenkonzentration sich ändert. Von den zu diesem Zwecke mit verschiedenen Metallsalzen angestellten Versuchen werde ich der Kürze halber jene mit $AgNO_3$ und mit $HgCl_2$ vorbringen: ersteres ($AgNO_3$) als Typus von stark ionisierten Elektrolyten; letzteres als Vertreter von wenig ionisierten Elektrolyten.

---

[1]) *W. Ostwald*, Chem. En. 2. Leipzig.

b) Versuche mit Silbersalzen.

I. Wie die hämolytische Tätigkeit bei Abnahme der Konzentration der Ag-Ionen abnimmt.

Ich habe 3 Versuchsgruppen mit $AgNO_3$-Lösungen angestellt, die ich bei bestimmten Konzentrationen mit NaCl- oder $Na_2S_2O_3$- oder Saccharoselösungen mischte[1]).

Bei Versuchen mit $AgNO_3$ und NaCl wird die experimentelle Möglichkeit von der äußerst niedrigen Löslichkeit des AgCl, die ja bekanntlich[2]) ungefähr 0,0013 g pro Liter beträgt, sehr beschränkt. Ich bereitete eine 0,0003 g % $AgNO_3$-Lösung zu, mischte dann 50 ccm dieser Lösung mit 50 ccm 2 g % NaCl-Lösung und erhielt durch dieses Verfahren eine 0,00015 g % $AgNO_3$- und eine 1 g % NaCl-Lösung. In Wirklichkeit kann man aber bei solchem Verfahren annehmen, eine Chlornatrium- und Silberchloridlösung mit Konzentration dieses letzten Salzes von 0,00124 g pro Liter vor sich zu haben. Diese Lösung wurde mit 1 g % NaCl-Lösung verdünnt. Auf diese Weise erhielt ich eine Reihe isotonischer NaCl-Lösungen mit verschiedenen Ag-Konzentrationen.

Zum Vergleiche mischte ich 50 ccm 0,0003 g % $AgNO_3$-Lösung mit 50 ccm 2,750 proz. KNO_3-Lösung. (Die Lösung dieses letzteren Salzes beträgt bei $\Delta = 0{,}58$ ungefähr 1,875 g %.) Diese erste Lösung wurde noch weiter, in demselben Verhältnisse wie die $AgNO_3$-Lösung früher mit NaCl, mit 1,875 g % KNO_3-Lösung verdünnt. Auf diese Weise erhielt ich 2 Lösungsreihen, von denen jede in der gleichen molekularen Konzentration Ag enthielt; die eine jedoch (Reihe α) in isotonischer KNO_3-, die andere (Reihe β) in isotonischer NaCl-Lösung.

Beiden Lösungen wurden 0,2 ccm Aufschwemmung mit 2 550 000 roten Blutkörperchen pro Kubikmillimeter hinzugefügt.

Ergebnisse und numerische Angaben sind in der Tabelle I zusammengefaßt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Untersuchungen in der Reihe α mit denen der Reihe β, so ersieht man daraus ganz klar, daß einer niedrigeren Konzentration der Ag-Ionen auch eine niedrigere hämolytische Tätigkeit entspricht.

[1]) Natürlich war das mögliche Versuchsfeld bei diesen Forschungen nicht so breit wie das, welches *Krönig*, *Paul* und *Spiro* bei ihren bekannten Versuchen über die antiseptische Wirkung der Ag''- und Hg''-Ionen zur Verfügung stand. In unserem Falle ist man am Gebrauche von Körpern, die für die roten Blutkörperchen keine besondere Giftwirkung haben, gebunden. So wird z. B. die Bestimmung einer Zurückdrängung der elektrolytischen Dissoziation bei $AgNO_3$ durch Hinzufügen von NH_3 oder KCN nicht möglich sein, denn durch die auf solche Weise verursachte Alkalinität ließe sich jede sichere Folgerung ausschließen. Überdies erlaubt nicht das notwendige Festhalten der Isotonie, ein Überschreiten gewisser Temperaturgrenzen.

[2]) *Kohlrausch* und *Holborn*, Das Leitvermögen der Elektrolyte. S. 216. Leipzig 1916.

Tabelle I.

Nr.	Reihe α							Reihe β [illegible] Statt KNO_3 [illegible] eine 1 g-proz. NaCl-Lösung gebraucht; das übrige gleich wie in Reihe α. Resultate n. 24 St[illegible]
	Versuch ausgeführt mit				Die Lösung enthält		Resultate nach 24 Stunden	
	$AgNO_3$		1,875 g-proz. KNO_3-Lösung ccm	Blutkörperchenaufschw. ccm	$AgNO_3$ g Äqu. pro Liter	$AgNO_3$ g Äqu. pro Blutkörperchen		
	g Äqu. pro Liter	ccm						
a	b	c	d	e	f	g	h	h′
1	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	1	9	0,2	$865 \cdot 10^{-10}$	$16{,}9 \cdot 10^{-19}$		
2	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	2	8	0,2	$173 \cdot 10^{-9}$	$33{,}9 \cdot 10^{-19}$		
3	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	3	7	0,2	$259 \cdot 10^{-9}$	$50{,}9 \cdot 10^{-19}$		
4	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	4	6	0,2	$346 \cdot 10^{-9}$	$67{,}8 \cdot 10^{-19}$		
5	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	5	5	0,2	$432 \cdot 10^{-9}$	$84{,}8 \cdot 10^{-19}$		
6	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	6	4	0,2	$519 \cdot 10^{-9}$	$10{,}1 \cdot 10^{-18}$	Spürchen	
7	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	7	3	0,2	$605 \cdot 10^{-9}$	$11{,}8 \cdot 10^{-18}$	+ +	
8	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	8	2	0,2	$692 \cdot 10^{-9}$	$13{,}5 \cdot 10^{-18}$	+	
9	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	9	1	0,2	$778 \cdot 10^{-9}$	$15{,}2 \cdot 10^{-18}$	+ + +	
10	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	10	—	0,2	$865 \cdot 10^{-9}$	$16{,}9 \cdot 10^{-18}$	+ + +	
11	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	2	8	0,2	$173 \cdot 10^{-8}$	$33{,}9 \cdot 10^{-18}$	+ + + +	
12	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	3	7	0,2	$259 \cdot 10^{-8}$	$50{,}9 \cdot 10^{-18}$	+ + + +	– –
13	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	4	6	0,2	$346 \cdot 10^{-8}$	$67{,}8 \cdot 10^{-18}$	+ + + +	– –
14	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	5	5	0,2	$432 \cdot 10^{-8}$	$84{,}8 \cdot 10^{-18}$	+ + + +	– – –
15	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	6	4	0,2	$519 \cdot 10^{-8}$	$10{,}1 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ + – –
16	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	7	3	0,2	$605 \cdot 10^{-8}$	$11{,}8 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ – – –
17	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	8	2	0,2	$692 \cdot 10^{-8}$	$13{,}5 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ – – –
18	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	9	1	0,2	$778 \cdot 10^{-8}$	$15{,}2 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ – – –
19	$88{,}235 \cdot 10^{-8}$	10	—	0,2	•$865 \cdot 10^{-8}$	$16{,}9 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ + – –

Aufschwemmung mit 2550000 Blutkörperchen pro cmm.

Die Minimalmenge $AgNO_3$ pro Blutkörperchen, die noch eine Spur von Hämolyse in KNO_3-Lösung gibt, kann zwischen g Äqu. $84{,}8 \cdot 10^{-19}$ und $10{,}1 \cdot 10^{-18}$ mit einem Mittelwerte von g Äqu. $92{,}9 \cdot 10_{-}^{19}$ inbegriffen werden. Die Minimalmenge, die noch Spuren von Hämolyse in NaCl-Lösung bewirkt, kann zwischen g Äqu. $33{,}9 \cdot 10^{-18}$ und $50{,}9 \cdot 10^{-18}$ mit einem Mittelwerte von g Äqu. $42{,}4 \cdot 10^{-18}$ inbegriffen werden, so daß zum Erhalten derselben Wirkung in Gegenwart von NaCl eine fast 5 mal größere Menge von $AgNO_3$ erforderlich ist, als die in Gegenwart von KNO_3 notwendig ist.

Bei Versuchen mit $AgNO_3$ und $Na_2S_2O_3$ ist die Versuchsmöglichkeit schon von vornherein dadurch beschränkt, daß das Thiosulfat in Überschuß vorhanden sein muß, um die Niederschlagsbildung von $Ag_2S_2O_3$ oder $Na(AgS_2O_3)$ zu verhüten und um das Komplexsalz $Na_4[Ag_2(S_2O_3)]$ zu erhalten. In diesem Salze bildet das Ag ein Glied des komplexen Anions, weswegen viele eigentümliche Reaktionen des Silbers ausbleiben[1]). Die Lösung des Natriumthiosulfates bei $\Delta = 0{,}58$ beträgt ungefähr 3,45 g/% ($Na_2S_2O_3 + 5\,H_2O$).

[1]) *E. Cohen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**, 61. 1895. — *W. Th. Richard* und *H. B. Faber*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**, 169. 1900.

Eine durch Verdünnung des $AgNO_3$ mit einer solchen Lösung angestellte Versuchsreihe wurde mit einer anderen verglichen, bei der die Verdünnung mit KNO_3 stattgefunden hatte. Auch der Zeitpunkt des Erscheinens der Hämolyse konnte berücksichtigt werden. Ergebnisse und numerische Angaben sind in der Tabelle II zusammengefaßt.

Aus den Angaben der Spalten g, h, i, h′, i′ dieser Tabelle habe ich die graphische Darstellung I erhalten; auf der Koordinate wurde der Zeitpunkt des Erscheinens der Hämolyse, auf der Abscisse die $AgNO_3$-Menge pro Blutkörperchen aufgetragen.

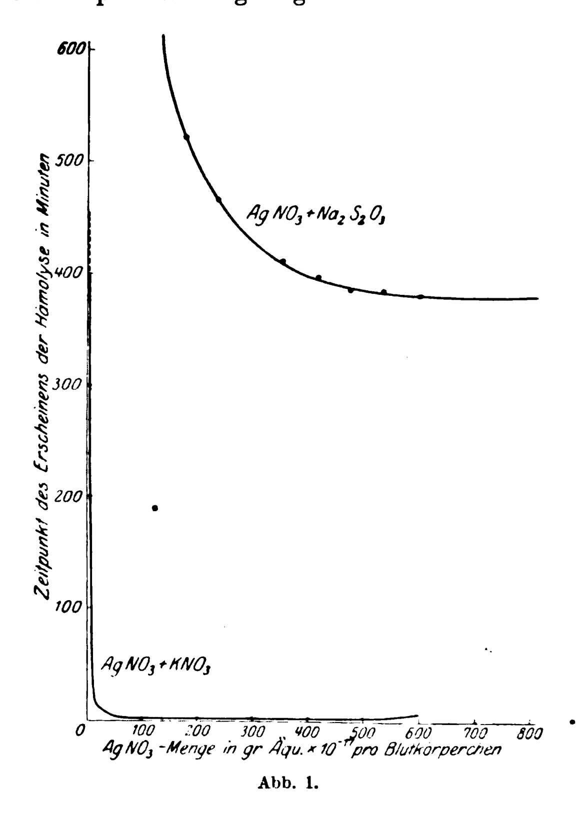
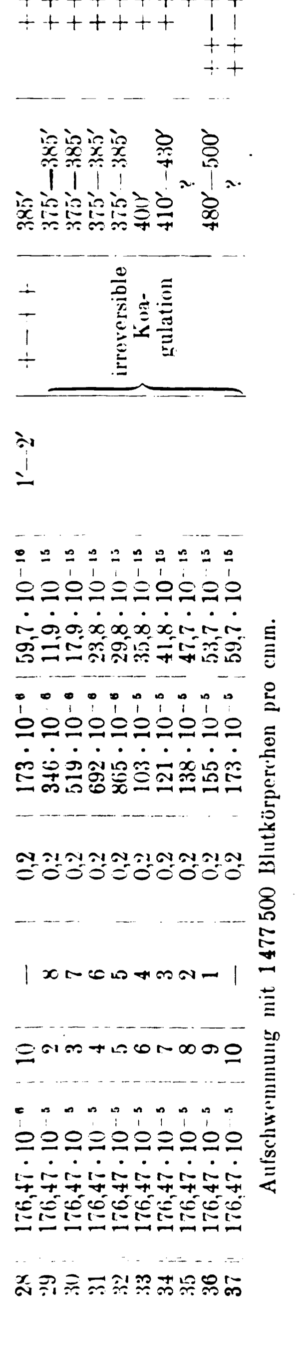


Abb. 1.

Es geht aus der Tabelle und Abbildung klar hervor, daß bei Abnahme der Silberionenkonzentration auch die hämolysierende Tätigkeit abnimmt. Die Minimalmenge $AgNO_3$ pro Blutkörperchen, die noch Spuren von Hämolyse in Gegenwart von KNO_3 gibt, kann zwischen g Äqu. $11{,}9 \cdot 10^{-18}$ und $17{,}9 \cdot 10^{-18}$ mit einem Mittelwerte von g Äqu. $14{,}9 \cdot 10^{-18}$ und in Gegenwart von $Na_2S_2O_3$ zwischen g Äqu. $41{,}8 \cdot 10^{-17}$ und $47{,}7 \cdot 10^{-17}$ mit einem Mittelwerte von g Äqu. $44{,}75 \cdot 10^{-17}$ inbegriffen werden. Um die gleiche Wirkung zu erhalten, ist also in Gegenwart

Tabelle II.

Nr.	Reihe α: Versuch ausgeführt mit: $AgNO_3$ g Äqu. pro Liter	$AgNO_3$ ccm	1,875 g-proz. KNO_3-Lösung ccm	Blutkörperchenaufschw. ccm	Die Lösung enthält: $AgNO_3$ g Äqu. pro Liter	$AgNO_3$ g Äqu. pro Blutkörperchen	Zeitpunkt des Erscheinens der Hämolyse	Resultate nach 24 Stunden	Reihe β (Statt KNO_3 wird eine 8,45 g-proz. $Na_2S_2O_3$-Lösung gebraucht. Das übrige gleich wie in Reihe α.): Zeitpunkt des Erscheinens der Hämolyse	Resultate nach 24 Stunden
a	b	c	d	e	f	g	h	i	h′	i′
1	$176,47 \cdot 10^{-8}$	1	9	0,2	$173 \cdot 10^{-9}$	$59,7 \cdot 10^{-19}$				
2	$176,47 \cdot 10^{-8}$	2	8	0,2	$346 \cdot 10^{-9}$	$11,9 \cdot 10^{-18}$				
3	$176,47 \cdot 10^{-8}$	3	7	0,2	$519 \cdot 10^{-9}$	$17,9 \cdot 10^{-18}$	?	Spürchen		
4	$176,47 \cdot 10^{-8}$	4	6	0,2	$692 \cdot 10^{-9}$	$23,8 \cdot 10^{-18}$	?	+		
5	$176,47 \cdot 10^{-8}$	5	5	0,2	$865 \cdot 10^{-9}$	$29,8 \cdot 10^{-18}$	390′—410′	+ — + +		
6	$176,47 \cdot 10^{-8}$	6	4	0,2	$103 \cdot 10^{-8}$	$35,8 \cdot 10^{-18}$	210′—220′	+ — + +		
7	$176,47 \cdot 10^{-8}$	7	3	0,2	$121 \cdot 10^{-8}$	$41,8 \cdot 10^{-18}$	80′—85′	+ + + +		
8	$176,47 \cdot 10^{-8}$	8	2	0,2	$138 \cdot 10^{-8}$	$47,7 \cdot 10^{-18}$	60′—70′	+ + + +		
9	$176,47 \cdot 10^{-8}$	9	1	0,2	$155 \cdot 10^{-8}$	$53,7 \cdot 10^{-18}$	50′—60′	+ + + +		
10	$176,47 \cdot 10^{-8}$	10	—	0,2	$173 \cdot 10^{-8}$	$59,7 \cdot 10^{-18}$	40′—45′	+ + + +		
11	$176,47 \cdot 10^{-7}$	2	8	0,2	$346 \cdot 10^{-8}$	$11,9 \cdot 10^{-17}$	25′	+ + + +		
12	$176,47 \cdot 10^{-7}$	3	7	0,2	$519 \cdot 10^{-8}$	$17,9 \cdot 10^{-17}$	10′—12′	+ + + +		
13	$176,47 \cdot 10^{-7}$	4	6	0,2	$692 \cdot 10^{-8}$	$23,8 \cdot 10^{-17}$	5′—6′	+ + + +		
14	$176,47 \cdot 10^{-7}$	5	5	0,2	$865 \cdot 10^{-8}$	$29,8 \cdot 10^{-17}$	3′	+ + + +		
15	$176,47 \cdot 10^{-7}$	6	4	0,2	$103 \cdot 10^{-7}$	$35,8 \cdot 10^{-17}$	2′—3′	+ + + +		
16	$176,47 \cdot 10^{-7}$	7	3	0,2	$121 \cdot 10^{-7}$	$41,8 \cdot 10^{-17}$	2′	+ + + +		
17	$176,47 \cdot 10^{-7}$	8	2	0,2	$138 \cdot 10^{-7}$	$47,7 \cdot 10^{-17}$	1′—2′	+ + + +	?	Spürchen
18	$176.47 \cdot 10^{-7}$	9	1	0,2	$155 \cdot 10^{-7}$	$53,7 \cdot 10^{-17}$	1′	+ + + +	?	„
19	$176,47 \cdot 10^{-7}$	10	—	0,2	$173 \cdot 10^{-7}$	$59,7 \cdot 10^{-17}$	$^1/_2$′	+ + + +	?	+
20	$176,47 \cdot 10^{-6}$	2	8	0,2	$346 \cdot 10^{-7}$	$11,9 \cdot 10^{-16}$	$^1/_6$′—$^1/_4$′	+ + + +	650′—670′	+ + + +
21	$176,47 \cdot 10^{-6}$	3	7	0,2	$519 \cdot 10^{-7}$	$17,9 \cdot 10^{-16}$	$^1/_6$′—$^1/_4$′	+ + + +	520′—530′	+ + + +
22	$176,47 \cdot 10^{-6}$	4	6	0,2	$692 \cdot 10^{-7}$	$23,8 \cdot 10^{-16}$	$^1/_6$′—$^1/_4$′	+ + + +	465′—475′	+ + + +
23	$176,47 \cdot 10^{-6}$	5	5	0,2	$865 \cdot 10^{-7}$	$29,8 \cdot 10^{-16}$	$^1/_6$′—$^1/_4$′	+ + + +	?	+ + + +
24	$176,47 \cdot 10^{-6}$	6	4	0,2	$103 \cdot 10^{-6}$	$35,8 \cdot 10^{-16}$	$^1/_6$′—$^1/_4$′	+ + + +	400′—430′	+ + + +
25	$176,47 \cdot 10^{-6}$	7	3	0,2	$121 \cdot 10^{-6}$	$41,8 \cdot 10^{-16}$	$^1/_6$′—$^1/_6$′	+ + + +	400′	+ + + +
26	$176,47 \cdot 10^{-6}$	8	2	0,2	$138 \cdot 10^{-6}$	$47,7 \cdot 10^{-16}$	$^1/_6$′—$^1/_4$′	+ + + +	390′	+ + + +



28	$176{,}47 \cdot 10^{-6}$	10	—	0,2	$173 \cdot 10^{-6}$	$59{,}7 \cdot 10^{-16}$	1'—2'	+ — + +	385'	+ + + +
29	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	2	8	0,2	$346 \cdot 10^{-6}$	$11{,}9 \cdot 10^{-15}$		irreversible Koagulation	375'—385'	+ + + +
30	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	3	7	0,2	$519 \cdot 10^{-6}$	$17{,}9 \cdot 10^{-15}$			375'—385'	+ + + +
31	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	4	6	0,2	$692 \cdot 10^{-6}$	$23{,}8 \cdot 10^{-15}$			375'—385'	+ + + +
32	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	5	5	0,2	$865 \cdot 10^{-6}$	$29{,}8 \cdot 10^{-15}$			375'—385'	+ + + +
33	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	6	4	0,2	$103 \cdot 10^{-5}$	$35{,}8 \cdot 10^{-15}$			400'	+ + + +
34	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	7	3	0,2	$121 \cdot 10^{-5}$	$41{,}8 \cdot 10^{-15}$			410'—430'	+ + + +
35	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	8	2	0,2	$138 \cdot 10^{-5}$	$47{,}7 \cdot 10^{-15}$			?	+ + +
36	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	9	1	0,2	$155 \cdot 10^{-5}$	$53{,}7 \cdot 10^{-15}$			480'—500'	+ + + | + +
37	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	10	—	0,2	$173 \cdot 10^{-5}$	$59{,}7 \cdot 10^{-15}$			?	+ + + | + +

Aufschwemmung mit 1477 500 Blutkörperchen pro cmm.

von $Na_2S_2O_3$ eine ungefähr 30mal größere $AgNO_3$-Menge notwendig als in Gegenwart von KNO_3.

Bei Versuchen mit $AgNO_3$ und Rohrzucker findet eine Abnahme der Konzentration der Silberionen infolge des durch die reduzierenden Eigenschaften der Saccharose[1]) gebildeten kolloidalen Silbers statt. Die Lösung des Rohrzuckers mit $\varDelta = 0{,}58$ beträgt ungefähr 10,3 g %[2]).

Eine durch Verdünnung des $AgNO_3$ mit einer solchen Lösung angestellte Versuchsreihe wurde mit einer anderen Versuchsreihe, bei welcher die Verdünnung mit KNO_3 vorgenommen wurde, verglichen.

Ergebnisse und numerische Angaben sind in Tabelle III zusammengefaßt.

Man bemerkt sofort, wie in Gegenwart von Rohrzucker eine bedeutende Abnahme der hämolytischen Tätigkeit des $AgNO_3$ stattfindet; und zwar kann die Minimalmenge, die noch eine Spur von Hämolyse aufweist, zwischen g Äqu. $59{,}7 \cdot 10^{-18}$ und $11{,}9 \cdot 10^{-17}$, mit einem Mittelwerte von g Äqu. $89{,}35 \cdot 10^{-18}$ pro Blutkörperchen inbegriffen werden; um die gleiche Wirkung zu erhalten, ist also in Gegenwart von Rohrzucker eine ungefähr 6mal größere $AgNO_3$-Menge notwendig als in Gegenwart von KNO_3[3]).

[1]) *Vogel*, Schweiz. Journ. f. Chem. u. Phys. **13**, 162. 1815. (*The Svedberg*. Meth. z. Herst. koll. Lös. Dresden 1909.)

[2]) $C_{12}H_{22}O_{11}$ g 10,3% $\varDelta = 0{,}58$.

[3]) Diese Versuche mit Rohrzucker sind nur zur Vervollständigung der anderen schon erwähnten angeführt; als Versuche für sich allein hätten sie keinen beweisführenden Wert. Denn die Bildung von kolloidalem Ag hat nicht nur eine Abnahme der Ionenkonzentration, sondern auch eine Abnahme der molekularen Konzentration zur Folge. — Außerdem muß noch die besondere Wirkung des Rohrzuckers auf die roten Blutkörperchen in Betracht gezogen werden. (*I. Bang*, diese Zeitschr. **16**, 253. 1909.)

Tabelle III.

Nr.	Reihe α: Versuch ausgeführt mit Ag NO$_3$ g Äqu. pro Liter	Ag NO$_3$ ccm	1,875 g-proz. KNO$_3$-Lösung ccm	Blutkörperchen-aufschw. ccm	Die Lösung: Ag NO$_3$ g Äqu. pro Liter	Ag NO$_3$ g Äqu. pro Blutkörperchen	Resultate nach 24 Stunden	Reihe β Statt KNO$_3$ wi… eine 10,3 g-pr… $C_{12}H_{22}O_{11}$-Lö… gebraucht; d… übrige gleich w… in Reihe α. Resultate na… 24 Stunden.
a	b	c	d	e	f	g	h	h′
1	$176{,}47 \cdot 10^{-8}$	1	9	0,2	$173 \cdot 10^{-9}$	$59{,}7 \cdot 10^{-19}$		
2	$176{,}47 \cdot 10^{-8}$	2	8	0,2	$346 \cdot 10^{-9}$	$11{,}9 \cdot 10^{-18}$		
3	$176{,}47 \cdot 10^{-8}$	3	7	0,2	$519 \cdot 10^{-9}$	$17{,}9 \cdot 10^{-18}$	Spürchen	
4	$176{,}47 \cdot 10^{-8}$	4	6	0,2	$692 \cdot 10^{-9}$	$23{,}8 \cdot 10^{-18}$	+	
5	$176{,}47 \cdot 10^{-8}$	5	5	0,2	$865 \cdot 10^{-9}$	$29{,}8 \cdot 10^{-18}$	+ − + +	
6	$176{,}47 \cdot 10^{-8}$	6	4	0,2	$103 \cdot 10^{-8}$	$35{,}8 \cdot 10^{-18}$	+ − + +	
7	$176{,}47 \cdot 10^{-8}$	7	3	0,2	$121 \cdot 10^{-8}$	$41{,}8 \cdot 10^{-18}$	+ + + +	
8	$176{,}47 \cdot 10^{-8}$	8	2	0,2	$138 \cdot 10^{-8}$	$47{,}7 \cdot 10^{-18}$	+ + + +	
9	$176{,}47 \cdot 10^{-8}$	9	1	0,2	$155 \cdot 10^{-8}$	$53{,}7 \cdot 10^{-18}$	+ + + +	
10	$176{,}47 \cdot 10^{-8}$	10	—	0,2	$173 \cdot 10^{-8}$	$59{,}7 \cdot 10^{-18}$	+ + + +	
11	$176{,}47 \cdot 10^{-7}$	2	8	0,2	$346 \cdot 10^{-8}$	$11{,}9 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ +
12	$176{,}47 \cdot 10^{-7}$	3	7	0,2	$519 \cdot 10^{-8}$	$17{,}9 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ +
13	$176{,}47 \cdot 10^{-7}$	4	6	0,2	$692 \cdot 10^{-8}$	$23{,}8 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ + + +
14	$176{,}47 \cdot 10^{-7}$	5	5	0,2	$865 \cdot 10^{-8}$	$29{,}8 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ + + +
15	$176{,}47 \cdot 10^{-7}$	6	4	0,2	$103 \cdot 10^{-7}$	$35{,}8 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ + + +
16	$176{,}47 \cdot 10^{-7}$	7	3	0,2	$121 \cdot 10^{-7}$	$41{,}8 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ + + +
17	$176{,}47 \cdot 10^{-7}$	8	2	0,2	$138 \cdot 10^{-7}$	$47{,}7 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ + + +
18	$176{,}47 \cdot 10^{-7}$	9	1	0,2	$155 \cdot 10^{-7}$	$53{,}7 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ + + +
19	$176{,}47 \cdot 10^{-7}$	10	—	0,2	$173 \cdot 10^{-7}$	$59{,}7 \cdot 10^{-17}$	+ + + +	+ + + +
20	$176{,}47 \cdot 10^{-6}$	2	8	0,2	$346 \cdot 10^{-7}$	$11{,}9 \cdot 10^{-16}$	+ + + +	+ + + +
21	$176{,}47 \cdot 10^{-6}$	3	7	0,2	$519 \cdot 10^{-7}$	$17{,}9 \cdot 10^{-16}$	+ + + +	+ + + +
22	$176{,}47 \cdot 10^{-6}$	4	6	0,2	$692 \cdot 10^{-7}$	$23{,}8 \cdot 10^{-16}$	+ + + +	+ + + +
23	$176{,}47 \cdot 10^{-6}$	5	5	0,2	$865 \cdot 10^{-7}$	$29{,}8 \cdot 10^{-16}$	+ + + +	+ + + +
24	$176{,}47 \cdot 10^{-6}$	6	4	0,2	$103 \cdot 10^{-6}$	$35{,}8 \cdot 10^{-16}$	+ + + +	+ + + +
25	$176{,}47 \cdot 10^{-6}$	7	3	0,2	$121 \cdot 10^{-6}$	$41{,}8 \cdot 10^{-16}$	+ + + +	+ + + +
26	$176{,}47 \cdot 10^{-6}$	8	2	0,2	$138 \cdot 10^{-6}$	$47{,}7 \cdot 10^{-16}$	+ + + +	+ + + +
27	$176{,}47 \cdot 10^{-6}$	9	1	0,2	$155 \cdot 10^{-6}$	$53{,}7 \cdot 10^{-16}$	+ + +	+ + + +
28	$176{,}47 \cdot 10^{-6}$	10	—	0,2	$173 \cdot 10^{-6}$	$59{,}7 \cdot 10^{-16}$	+ − + +	+ + + +
29	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	2	8	0,2	$346 \cdot 10^{-6}$	$11{,}9 \cdot 10^{-15}$	irreversible Koagulation	+ + + +
30	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	3	7	0,2	$519 \cdot 10^{-6}$	$17{,}9 \cdot 10^{-15}$		+ +
31	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	4	6	0,2	$692 \cdot 10^{-6}$	$23{,}8 \cdot 10^{-15}$		+ + +
32	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	5	5	0,2	$865 \cdot 10^{-6}$	$29{,}8 \cdot 10^{-15}$		+
33	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	6	4	0,2	$103 \cdot 10^{-5}$	$35{,}8 \cdot 10^{-15}$		Spürchen
34	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	7	3	0,2	$121 \cdot 10^{-5}$	$41{,}8 \cdot 10^{-15}$		"

Aufschwemmung mit 1 477 500 Blutkörperchen pro cmm.

II. Wie sich die hämolytische Tätigkeit bei verschiedenen Ag-Salzen ändert.

Was dieses Thema anbelangt, so will ich bloß das, was *Ascoli* und *Novello*[1]) darüber geäußert haben, erwähnen. Letztere behaupten, ohne jedoch irgendwelche experimentelle Daten vorzubringen, bemerkt zu haben, daß „il existe un rapport entre la dissociation des sels d'Ag

[1]) *M. Ascoli* et *F. Novello*, Compt. rend. soc. de biol. **64**, 724. 1908.

et leur activité hémolytique. Les sels qui contennent d'Hg sans forme d'ion complexe sont beaucaup moins actifs."

Nach dem bisher Vorgebrachten scheint die Folgerung, daß der Erreger der Hämolyse bei den Ag-Salzen das Silberion sei, wohl gerechtfertigt.

c) Versuche mit Hg-Verbindungen.

I. Wie die hämolytische Tätigkeit bei Abnahme der Konzentration der Hg-Ionen abnimmt.

Ich habe verschiedene Versuchsgruppen mit $HgCl_2$-Lösung angestellt, die ich mit NaCl, NaBr, NaJ oder NaS_2O_3-Lösungen mischte. Bekanntlich ist ja der Dissoziationsgrad des $HgCl_2$ höher als der des $HgBr_2$, und der Dissoziationsgrad dieses Salzes höher als der des HgJ_2. Und zwar sind die Werte der Dissoziationskonstanten, wie man sie in der Literatur vorfindet, folgende:

$$k = \frac{Hg^{\cdot\cdot} \cdot X_2'}{HgX_2}$$

	$HgCl_2$	$HgBr_2$	HgJ_2
Morse [1])	$1 \cdot 10^{-14}$	$2 \cdot 10^{-18}$	$1 \cdot 10^{-25}$
Sherril [2])	$1 \cdot 10^{-14}$	$6{,}5 \cdot 10^{-18}$	$4 \cdot 10^{-25}$

Ebenso ist bekannt, wie die Mercurihaloide mit den Alkalihaloiden Verbindungen eingehen mit Bildung von Komplexsalzen. In den Lösungen dieser Komplexsalze sind $HgCl_4''$, $HgBr_4''$ und HgJ_4'' die vorherrschenden Ionen, wie aus den folgenden, von *Sherril* bestimmten Konstanten hervorgeht:

$$k = \frac{[HgX_4'']}{[Hg^{\cdot\cdot}][X']^4}$$

X = Cl	$k = 9 \cdot 10^{15}$
X = Br	$k = 4{,}3 \cdot 16^{21}$
X = J	$k = 0{,}1 \cdot 10^{30}$

Man ersieht aus den angeführten Zahlen, wie äquivalente Lösungen von Mercurinatriumchlorid, Mercurinatriumbromid und Mercurinatriumjodid verschiedene $Hg^{\cdot\cdot}$-Konzentrationen enthalten; und zwar enthält eine höhere Konzentration das Erste, eine niedrigere das Zweite, eine noch niedrigere das Dritte.

Ich bereitete eine 1 g-proz. $HgCl_2$- und 0,955 g-proz. NaCl-Mischlösung mit $\Delta = 0{,}585$ [3]).

Diese erste Lösung wurde dann verschieden mit einer 1 g-proz. NaCl-Lösung verdünnt. Eine zweite 1 g-proz. $HgCl_2$- und 2,314 g-proz. NaBr-Mischlösung wurde dann entsprechend mit einer 2,314 g-proz. [4]) NaBr-Lösung verdünnt. Eine dritte 1 g-proz. $HgCl_2$- und 3,1 g-proz. NaJ-

---

[1]) *H. Morse*, Zeitschr. f. physik. Chem. **41**, 709. 1902.

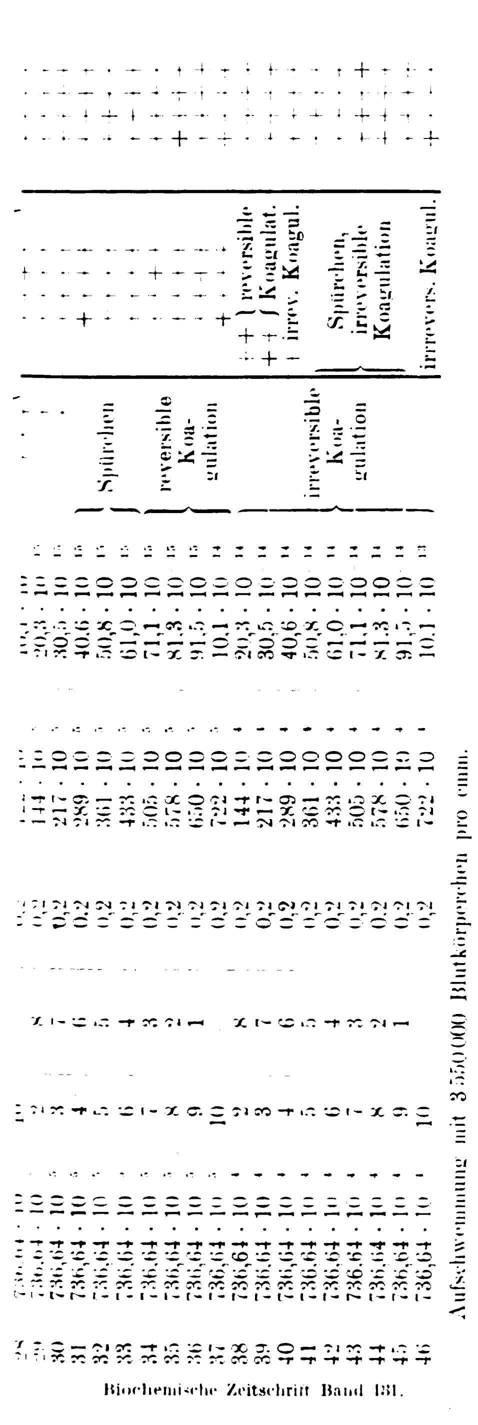
[2]) *M. Sherril*, Zeitschr. f. physik. Chem. **43**, 705. 1903.

[3]) *E. Meneghetti*, l. c.

[4]) NaBr + 2 H_2O 2,314 g-proz. $\Delta = 0{,}58$.

Tabelle IV.

Nr.	Reihe α							Reihe β Statt NaCl wird eine 2,814 g-proz. NaBr-Lösung gebraucht. Das übrige gleich wie in Reihe α. Resultate nach 24 Stunden	Reihe γ Statt NaCl wird eine 8,1 g-proz. NaJ-Lösung gebraucht. Das übrige gleich wie in Reihe α. Resultate nach 24 Stunden
	Versuch ausgeführt mit				Die Lösung enthält		Resultate nach 24 Stunden		
	$HgCl_2$ g Äqu. pro Liter	$HgCl_2$ ccm	1 g-proz. NaCl-Lösung ccm	Blutkörperchenaufschw. ccm	$HgCl_2$ g Äqu. pro Liter	$HgCl_2$ g Äqu. pro Blutkörperchen			
a	b	c	d	e	f	g	h	h'	h''
1	$736{,}64 \cdot 10^{-8}$	1	9	0,2	$722 \cdot 10^{-9}$	$10{,}1 \cdot 10^{-18}$			
2	$736{,}64 \cdot 10^{-8}$	2	8	0,2	$144 \cdot 10^{-8}$	$20{,}3 \cdot 10^{-18}$			
3	$736{,}64 \cdot 10^{-8}$	3	7	0,2	$217 \cdot 10^{-8}$	$30{,}5 \cdot 10^{-18}$			
4	$736{,}64 \cdot 10^{-8}$	4	6	0,2	$289 \cdot 10^{-8}$	$40{,}6 \cdot 10^{-18}$			
5	$736{,}64 \cdot 10^{-8}$	5	5	0,2	$361 \cdot 10^{-8}$	$50{,}8 \cdot 10^{-18}$	Spürchen		
6	$736{,}64 \cdot 10^{-8}$	6	4	0,2	$433 \cdot 10^{-8}$	$61{,}0 \cdot 10^{-18}$	++		
7	$736{,}64 \cdot 10^{-8}$	7	3	0,2	$505 \cdot 10^{-8}$	$71{,}1 \cdot 10^{-18}$	+++		
8	$736{,}64 \cdot 10^{-8}$	8	2	0,2	$578 \cdot 10^{-8}$	$81{,}3 \cdot 10^{-18}$	++++	Spürchen	
9	$736{,}64 \cdot 10^{-8}$	9	1	0,2	$650 \cdot 10^{-8}$	$91{,}5 \cdot 10^{-18}$	+++	++	
10	$736{,}64 \cdot 10^{-8}$	10		0,2	$722 \cdot 10^{-8}$	$10{,}1 \cdot 10^{-17}$	++++	++++	
11	$736{,}64 \cdot 10^{-7}$	2	8	0,2	$144 \cdot 10^{-7}$	$20{,}3 \cdot 10^{-17}$	++++	++++	
12	$736{,}64 \cdot 10^{-7}$	3	7	0,2	$217 \cdot 10^{-7}$	$30{,}5 \cdot 10^{-17}$	++++	++++	Spürchen
13	$736{,}64 \cdot 10^{-7}$	4	6	0,2	$289 \cdot 10^{-7}$	$40{,}6 \cdot 10^{-17}$	++++	++++	+
14	$736{,}64 \cdot 10^{-7}$	5	5	0,2	$361 \cdot 10^{-7}$	$50{,}8 \cdot 10^{-17}$	++++	++++	+++
15	$736{,}64 \cdot 10^{-7}$	6	4	0,2	$433 \cdot 10^{-7}$	$61{,}0 \cdot 10^{-17}$	++++	++++	++++
16	$736{,}64 \cdot 10^{-7}$	7	3	0,2	$505 \cdot 10^{-7}$	$71{,}1 \cdot 10^{-17}$	++++	++++	++++
17	$736{,}64 \cdot 10^{-7}$	8	2	0,2	$578 \cdot 10^{-7}$	$81{,}3 \cdot 10^{-17}$	++++	++++	++++
18	$736{,}64 \cdot 10^{-7}$	9	1	0,2	$650 \cdot 10^{-7}$	$91{,}5 \cdot 10^{-17}$	++++	++++	++++
19	$736{,}64 \cdot 10^{-7}$	10	—	0,2	$722 \cdot 10^{-7}$	$10{,}1 \cdot 10^{-16}$	++++	++++	++++
20	$736{,}64 \cdot 10^{-6}$	2	8	0,2	$144 \cdot 10^{-6}$	$20{,}3 \cdot 10^{-16}$	++++	++++	++++
21	$736{,}64 \cdot 10^{-6}$	3	7	0,2	$217 \cdot 10^{-6}$	$30{,}5 \cdot 10^{-16}$	++++	++++	++++
22	$736{,}64 \cdot 10^{-6}$	4	6	0,2	$289 \cdot 10^{-6}$	$40{,}6 \cdot 10^{-16}$	++++	++++	++++
23	$736{,}64 \cdot 10^{-6}$	5	5	0,2	$361 \cdot 10^{-6}$	$50{,}8 \cdot 10^{-16}$	++++	++++	++++
24	$736{,}64 \cdot 10^{-6}$	6	4	0,2	$433 \cdot 10^{-6}$	$61{,}0 \cdot 10^{-16}$	++++	++++	++++
25	$736{,}64 \cdot 10^{-6}$	7	3	0,2	$505 \cdot 10^{-6}$	$71{,}1 \cdot 10^{-16}$	++++	++++	++++
26	$736{,}64 \cdot 10^{-6}$	8	2	0,2	$578 \cdot 10^{-6}$	$81{,}3 \cdot 10^{-16}$	++++	++++	++++
27	$736{,}64 \cdot 10^{-6}$	9	1	0,2	$650 \cdot 10^{-6}$	$91{,}5 \cdot 10^{-16}$	++++	++++	++++



28	736,64 · 10	[illegible]		0,2	[illegible]	10,1 · 10	·	·	·	·	·	·	·	·	·
29	736,64 · 10	2	8	0,2	144 · 10	20,3 · 10	·	·	·	·	·	·	·	·	·
30	736,64 · 10	3	7	0,2	217 · 10	30,5 · 10	·	·	·	·	·	·	·	·	·
31	736,64 · 10	4	6	0,2	289 · 10	40,6 · 10	Spürchen	+	·	·	·	·	·	·	·
32	736,64 · 10	5	5	0,2	361 · 10	50,8 · 10	Spürchen	·	·	·	·	·	·	·	·
33	736,64 · 10	6	4	0,2	433 · 10	61,0 · 10	Spürchen	·	·	·	·	·	·	·	·
34	736,64 · 10	7	3	0,2	505 · 10	71,1 · 10	reversible Koagulation	·	·	+	·	·	·	·	·
35	736,64 · 10	8	2	0,2	578 · 10	81,3 · 10	reversible Koagulation	·	·	·	·	+	·	·	·
36	736,64 · 10	9	1	0,2	650 · 10	91,5 · 10	reversible Koagulation	·	·	·	·	·	·	·	·
37	736,64 · 10	10		0,2	722 · 10	10,1 · 10	reversible Koagulation	+	·	·	·	·	·	·	·
38	736,64 · 10	2	8	0,2	144 · 10	20,3 · 10	irreversible Koagulation	· + reversible Koagulat.				·	·	·	·
39	736,64 · 10	3	7	0,2	217 · 10	30,5 · 10	irreversible Koagulation	+ · reversible Koagulat.				·	·	·	·
40	736,64 · 10	4	6	0,2	289 · 10	40,6 · 10	irreversible Koagulation	· irrev. Koagul.				·	·	·	·
41	736,64 · 10	5	5	0,2	361 · 10	50,8 · 10	irreversible Koagulation	Spürchen, irreversible Koagulation				·	·	·	·
42	736,64 · 10	6	4	0,2	433 · 10	61,0 · 10	irreversible Koagulation	Spürchen, irreversible Koagulation				·	·	·	·
43	736,64 · 10	7	3	0,2	505 · 10	71,1 · 10	irreversible Koagulation	Spürchen, irreversible Koagulation				·	+	·	+
44	736,64 · 10	8	2	0,2	578 · 10	81,3 · 10	irreversible Koagulation	Spürchen, irreversible Koagulation				·	·	·	·
45	736,64 · 10	9	1	0,2	650 · 10	91,5 · 10	irreversible Koagulation	Spürchen, irreversible Koagulation				·	·	·	·
46	736,64 · 10	10		0,2	722 · 10	10,1 · 10	irreversible Koagulation	irrrevers. Koagul.				+	·	·	·

Aufschwemmung mit 3550000 Blutkörperchen pro cmm.

Mischlösung wurde wie die vorigen, jedoch mit einer 3,1 g-proz. NaJ-Lösung verdünnt [1]).

So erhielt ich 3 Lösungsreihen, von denen jede das Hg in der gleichen molekularen Konzentration enthielt, jedoch die eine Lösungsreihe in isotonischer NaCl, die andere in NaBr-, die dritte in NaJ-Lösung.

Jeder dieser Lösungen wurden 0,2 ccm 3550000 Blutkörperchen pro Kubikmillimeter enthaltende Blutkörperchenaufschwemmung hinzugefügt. — Ergebnisse und numerische Angaben sind in Tabelle IV zusammengefaßt.

Wenn man die Ergebnisse der 3 Versuchsgruppen vergleicht, so ersieht man deutlich daraus, wie die Hg-Komplexsalze[2]) eine hämolytische und koagulierende Tätigkeit aufweisen, die sich parallel mit ihrem Dissoziationsgrade ändert.

Die Minimalmenge $HgCl_2$ pro Blutkörperchen, die noch in Gegenwart von NaCl Hämolyse gibt, ist zwischen g Äqu. $40{,}6 \cdot 10^{-18}$ und $50{,}8 \cdot 10^{-18}$ mit einem Mittel-

[1]) $NaJ + 2\,H_2O$ 3,1 g-proz.
I 0,58.

[2]) Bekanntlich bilden die Mercurihaloide auch in solchen Alkalihaloidlösungen, die keinen Ion mit dem Mercurisalze gemeinsam haben (z. B. HgJ_2 in KCl), gemischt-anionische Komplexe. *Fulda* findet, daß in den obigen Lösungen der Komplex $[HgJ_2Cl'']$ beständig ist. Jedoch wird man in derartigen Lösungen auch mit einem doppelten Umsatze: $HgJ_2 + 2\,KCl = HgCl_2 + KJ$ und deshalb auch mit der Bildung der einfachen Komplexe AgJ_4'' und $HgCl_4''$ zu rechnen haben. (*R. Abegg*, Handb. d. anorgan. Chemie. 2. Bd. II. Abtg. Hbtg. S. 657. Leipzig 1905.)

werte von g Äqu. $45{,}7 \cdot 10^{-18}$ inbegriffen; in Gegenwart von NaBr, zwischen g Äqu. $71{,}1 \cdot 10^{-18}$ und $81{,}3 \cdot 10^{-18}$ mit einem Mittelwerte von g Äqu. $76{,}2 \cdot 10^{-18}$, und in Gegenwart von NaJ, zwischen g Äqu. $20{,}3 \cdot 10^{-17}$ und $30{,}5 \cdot 10^{-17}$ mit einem Mittelwerte von g Äqu. $25{,}4 \cdot 10^{-17}$.

Die Minimalmenge $HgCl_2$ pro Blutkörperchen, die irreversible Koagulation bewirkt, ist in Gegenwart von NaCl zwischen g Äqu. $10{,}1 \cdot 10^{-14}$ und $20{,}3 \cdot 10^{-14}$ mit einem Mittelwerte von g Äqu. $17{,}2 \cdot 10^{-14}$, in Gegenwart von NaBr zwischen g Äqu. $30{,}5 \cdot 10^{-14}$ und $40{,}6 \cdot 10^{-14}$ mit einem Mittelwerte von g Äqu. $35{,}5 \cdot 10^{-14}$. In NaJ-Lösung wurde auch bei den höchsten Konzentrationen keine Koagulation bemerkt.

Bei Untersuchungen mit $HgCl_2$ und $Na_2S_2O_3$ sind die Versuchsmöglichkeiten schon von vornherein dadurch beschränkt, daß das Thiosulfat in Überschuß vorhanden sein muß, analog dem, was früher schon bei den Untersuchungen mit $HgNO_3$ und $Na_2S_2O_3$ gesagt wurde.

Eine durch verschiedenartige Verdünnung von $HgCl_2$ mit einer 3,45 g-proz. $Na_2S_2O_3 + 5\,H_2O$-Lösung angestellte Lösungsreihe wurde mit einer anderen verglichen, bei welcher identische Verdünnungen mit Anwendung von 1 g-proz. NaCl erhalten wurden. Bei diesen Untersuchungen habe ich auch den Zeitpunkt des Erscheinens der Hämolyse in Betracht ziehen können. Ergebnisse und numerische Angaben sind in Tabelle V zusammengefaßt.

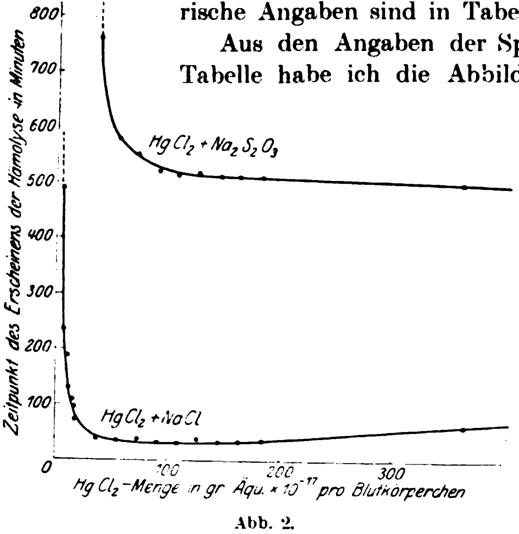


Abb. 2.

Aus den Angaben der Spalten g, h, i, h′, i′ dieser Tabelle habe ich die Abbildung 2 erhalten; auf der Abscisse wurde die $HgCl_2$-Menge pro Blutkörperchen, auf der Koordinate der Zeitpunkt des Erscheinens der Hämolyse aufgetragen.

Es geht aus der Tabelle und Abbildung klar hervor, daß bei Abnahme der Konzentration des $Hg^{\cdot\cdot}$ auch die hämolytische Tätigkeit abnimmt. Die Minimalmenge $HgCl_2$ pro Blutkörperchen, die noch Hämolyse gibt, ist in Gegenwart von NaCl zwischen g Äqu. $36{,}8 \cdot 10^{-18}$ und $55{,}2 \cdot 10^{-18}$ mit einem Mittelwerte von g Äqu. $46{,}0 \cdot 10^{-18}$, und in Gegenwart von $Na_2S_2O_3$ zwischen g Äqu. $36{,}8 \cdot 10^{-17}$ und $55{,}2 \cdot 10^{-17}$ mit einem Mittelwerte von g Äqu. $46{,}0 \cdot 10^{-17}$ inbegriffen.

Nr.	Reihe α									Reihe β	
	Versuch ausgeführt mit				Die Lösung enthält		Zeitpunkt des Erscheinens der Hämolyse	Resultate nach 24 Stunden	Statt NaCl wird eine 3,45 g-proz. $Na_2S_2O_3$-Lösung gebraucht. Das übrige gleich wie in Reihe α	
	$HgCl_2$		1 g-proz. NaCl-Lösung ccm	Blutkörperchen-Aufschwemm. ccm	$HgCl_2$ g Äqu. pro Liter	$HgCl_2$ g Äqu. pro Blutkörperchen			Zeitpunkt des Erschein. d. Hämol.	Resultate nach 24 Stunden
	g Äqu. pro Liter	ccm								
a	b	c	d	e	f	g	h	i	h'	i'
1	736,64 · 10^{-8}	1	9	0,2	722 · 10^{-9}	18,4 · 10^{-18}				
2	736,64 · 10^{-8}	2	8	0,2	144 · 10^{-8}	36,8 · 10^{-18}				
3	736,64 · 10^{-8}	3	7	0,2	217 · 10^{-8}	55,2 · 10^{-18}	?	Spürchen		
4	736,64 · 10^{-8}	4	6	0,2	289 · 10^{-8}	73,6 · 10^{-18}	480′—500′	+		
5	736,64 · 10^{-8}	5	5	0,2	361 · 10^{-8}	92,0 · 10^{-18}	230′—240′	++++		
6	736,64 · 10^{-8}	6	4	0,2	433 · 10^{-8}	11,0 · 10^{-17}	185′—190′	++++		
7	736,64 · 10^{-8}	7	3	0,2	505 · 10^{-8}	12,8 · 10^{-17}	125′—130′	++++		
8	736,64 · 10^{-8}	8	2	0,2	578 · 10^{-8}	14,7 · 10^{-17}	105′—110′	++++		
9	736,64 · 10^{-8}	9	1	0,2	650 · 10^{-8}	16,5 · 10^{-17}	90′—95′	++++		
10	736,64 · 10^{-8}	10	—	0,2	722 · 10^{-8}	18,4 · 10^{-17}	69′—70′	++++		
11	736,64 · 10^{-7}	2	8	0,2	144 · 10^{-7}	36,8 · 10^{-17}	36′	++++		
12	736,64 · 10^{-7}	3	7	0,2	217 · 10^{-7}	55,2 · 10^{-17}	34′	++++	560′—590′	+
13	736,64 · 10^{-7}	4	6	0,2	289 · 10^{-7}	73,6 · 10^{-17}	35′	++++	540′—560′	+++
14	736,64 · 10^{-7}	5	5	0,2	361 · 10^{-7}	92,0 · 10^{-17}	32′—33′	++++	510′—530′	++++
15	736,64 · 10^{-7}	6	4	0,2	433 · 10^{-7}	11,0 · 10^{-16}	32′	++++	510′—520′	++++
16	736,64 · 10^{-7}	7	3	0,2	505 · 10^{-7}	12,8 · 10^{-16}	36′	++++	510′—520′	++++
17	736,64 · 10^{-7}	8	2	0,2	578 · 10^{-7}	14,7 · 10^{-16}	35′—36′	++++	500′—520′	++++
18	736,64 · 10^{-7}	9	1	0,2	650 · 10^{-7}	16,5 · 10^{-16}	35′—36′	++++	500′—520′	++++
19	736,64 · 10^{-7}	10	—	0,5	722 · 10^{-7}	18,4 · 10^{-16}	35′—36′	++++	500′—520′	++++
20	736,64 · 10^{-6}	2	8	0,2	144 · 10^{-6}	36,8 · 10^{-16}	62′	++++	500′—520′	++++
21	736,64 · 10^{-6}	3	7	0,2	217 · 10^{-6}	55,2 · 10^{-16}	100′—110′	+++	?	++++
22	737,64 · 19^{-6}	4	6	0,2	289 · 10^{-6}	73,6 · 10^{-16}	160′—170′	+++	?	++++
23	736,64 · 10^{-6}	5	5	0,2	361 · 10^{-6}	92,0 · 10^{-16}	200′	++	530′—540′	++++
24	736,64 · 10^{-6}	6	4	0,2	433 · 10^{-6}	11,0 · 10^{-15}	250′—270′	+++	540′—550′	++++
25	736,64 · 10^{-6}	7	3	0,2	505 · 10^{-6}	12,8 · 10^{-15}	?	++	?	++++
26	736,64 · 10^{-6}	8	2	0,2	578 · 10^{-6}	14,7 · 10^{-15}	?	+	560′—590′	++++
27	736,64 · 19^{-6}	9	1	0,2	650 · 10^{-6}	16,5 · 10^{-15}	?	+	?	++++
28	736,64 · 10^{-6}	10	—	0,2	722 · 10^{-5}	18,4 · 10^{-15}	430′—480′	Spürchen	590′—620′	++—+++

Aufschwemmung mit 1975000 Blutkörperchen pro cmm.

Man kann demnach den Schluß ziehen, daß die hämolytische Tätigkeit des $HgCl_2$ (dasselbe hat man früher für die des $AgNO_3$ gesehen) dem metallischen Ion zuzuschreiben sei und daß sie eben bei verschiedener Konzentration dieses letzten verschieden ist.

II. Wie sich die hämolytische Tätigkeit bei verschiedenen Hg-Verbindungen ändert.

Bei diesem Thema ist es angebracht, die interessanten Versuche *Bechholds*[1]) über die hämolytische und koagulierende Tätigkeit verschiedener Hg-Verbindungen in Erinnerung zu bringen. *Bechhold* teilt diese Verbindungen in mehrere Gruppen ein, und zwar solche, die:

Gruppe A I: sofort in Wasser und Serum ionisiert,
„ A II: nach einiger Zeit in Wasser und Serum ionisiert,
„ B: in Wasser nicht ionisiert, durch Serum zerlegt,
„ C: weder in Wasser ionisiert, noch durch Serum zerlegt
werden.

Das Vorhandensein oder Fehlen der Hg-Ionen wurde aus dem Erscheinen oder Ausbleiben einer Schwarz- bzw. Braunfärbung durch Zusatz von Schwefelammonlösung bestimmt. Durch Hinzufügen von roten Ochsenblutkörperchen erhielt man mit den Verbindungen der Gruppe A I in höheren Konzentrationen irreversible Koagulation, in niederer Konzentration Hämolyse.

Die Verbindungen der Gruppen A II und B zeigen teils in höchsten Konzentrationen irreversible Koagulation, meist neben etwas Hämolyse, in niederen Konzentrationen nur Hämolyse, keinerlei irreversible Koagulation.

Das Aufstellen von numerischen, vergleichenden Gegenüberstellungen zwischen den verschiedenen Gruppen ist nicht möglich, weil ja *Bechhold* „der Einfachheit halber nicht molekulare, sondern Gewichtskonzentrationen prüft". Immerhin kann die Gegenüberstellung einiger Ziffern nicht ganz ohne Erfolg sein.

Eine typische Verbindung der Gruppe A I ist das $HgCl_2$, welches in den von *Bechhold* vorgenommenen experimentellen Bedingungsarten Hämolyse auch noch bei einer Konzentration von 1 : 200 000 gibt. Die Verbindungen der Gruppen A II und B (z. B. α-Phenylenquecksilberoxyd und Alaninquecksilbersalicylat) geben bei einer Konzentration von 1 : 32 000 nicht mehr Hämolyse oder bloß Spuren davon oder partielle Hämolyse.

Die Verbindungen der Gruppe C (z. B. o-Mercuribenzoesäureanhydrid) geben Hämolyse nur bei sehr hohen Konzentrationen (1 : 200).

---

[1]) *H. Bechhold*, Über die Hämolyse durch Quecksilber und Quecksilberverbindungen. Arbeit. aus d. Inst. f. experim. Ther. u. d. Georg Speyer-Hause z. Frankfurt a. M. H. 11, S. 25. 1920.

Man darf demnach folgern, daß elektrolytische Dissoziation und hämolytische (auch koagulierende) Tätigkeit in den Hg-Verbindungen parallel verlaufen; je höher die elektrolytische Dissoziation einer Verbindung ist, um so größer ist auch ihre hämolytische Tätigkeit; und so wird eine solche Verbindung Hämolyse bei niedrigeren Konzentrationen bewirken als eine weniger ionisierte Verbindung. Dies entspricht vollkommen dem, was ich durch verschiedenartige Bestimmung der Zurückdrängung der Dissoziation beim $HgCl_2$ erwiesen habe; deshalb ist auch die Behauptung gerechtfertigt, der Erreger der Hämolyse sei das Ion Hg.

Bechhold dagegen meint, „es sei wahrscheinlich gemacht, daß für die Hämolyse die Molekeln der untersuchten Quecksilberverbindungen verantwortlich sind. Der strikte Beweis dafür stehe noch aus, da es keine vollkommen ionisierte Quecksilberverbindungen gibt“. Wenn man jedoch die Hg-Hämolyse nicht allein an und für sich betrachtet, sondern die Hämolysen in ihrem gesamten, vielfachen Bilde, wie sie durch die verschiedenen Metalle bewirkt sind, berücksichtigt, so dürfte über den Erreger der Hämolyse doch kein Zweifel bestehen.

Das unter den untersuchten Salzen am raschesten hämolytisch tätige ist das $AgNO_3$, welches man als vollkommen ionisiert annehmen kann.

Die von *Bechhold* bemerkte Tatsache, daß einige Verbindungen, ohne die Reaktion des Hg-Ions mit $(NH_4)_2S$ aufzuweisen, trotzdem Hämolyse geben, genügt allerdings nicht zum Beweise, daß das Ion nicht der Erreger der Hämolyse sei; das Nichterscheinen der Reaktion kann ja nicht als Beweis der vollkommenen Abwesenheit der Ionen gelten. Auch werden wir die Anwesenheit der Hg-Ionen bei minimalen Konzentrationen, die noch Hämolyse geben, nicht bestreiten wollen, obwohl ihre Anwesenheit durch kein chemisches Reagens festzustellen ist. Man muß eben mit der verschiedenen Empfindlichkeit der Reagentien rechnen; und daß einige biologische Reaktionen viel empfindlicher sind als jede chemische Reaktion, wird durch die zarte Empfindlichkeit des Geruchsinnes, durch zahlreiche pharmakologische und besonders durch die sog. oligodynamischen Wirkungen bestätigt.

Auch möchte ich bei dieser Gelegenheit die ausgezeichneten Untersuchungen *Bechholds*[1]) über die Löslichkeit des metallischen Silbers und einiger gewöhnlich für unlöslich gehaltenen Ag-Salze erwähnen. In diesen Untersuchungen wird eben ein biologischer Faktor (die stärkere oder schwächere Entwicklung von Staphylokokkenkolonien) als Indikator der verschiedenen Löslichkeit in Anspruch genommen.

Aus dem bisher Erwähnten scheint daher die Folgerung, daß in den

---

[1]) *H. Bechhold*, Kolloid-Zeitschr. **25**, 158. 1919.

untersuchten Lösungen der wirkende Faktor der Hämolyse das metallische Ion sei, doch berechtigt zu sein.

d) Vergleichende Gegenüberstellung der desinfizierenden, toxischen und hämolytischen Wirkung der Schwermetallsalze.

Bekanntlich steht die Desinfektionskraft der Schwermetallsalze, nach den Forschungen von *Paul* und *Krönig*[1]), *Spiro* und *Scheuerlen*[2]), im Verhältnisse mit dem Dissoziationsgrade der Lösungen, und zwar ändert sich diese parallel mit der Konzentration der Metallionen. So wird bei Anwesenheit von $Na_2S_2C_3$ in einer Hg-NO_3-Lösung die Desinfektionskraft des Silbersalzes bedeutend heruntergedrückt; desgleichen nimmt die antiseptische Wirkung des $HgCl_3$ in Gegenwart von Chlor-, Brom- und Jodkalium ab, und zwar in folgendem Maße: $KCl > KBr > KJ$.

Das gleiche Fortschreiten haben wir vorher schon in der hämolytischen Tätigkeit des Quecksilberchlorides vorgefunden. Ebenso[3]) nimmt die tödliche Minimalmenge des $AgNO_3$ pro kg Kaninchenkörpergewicht bei intravenöser Einführung des Silbersalzes in $Na_2S_2O_3$-Lösung bedeutend zu.

Dasselbe geschieht[4]), wie es aus folgender Tabelle ersichtlich ist, auch für das $HgCl_2$.

Tabelle VI.

Tödliche $HgCl_2$-Minimalmenge beim Kaninchen	
Gemischt mit	g Äqu. pro kg Körpergewicht
a	b
NaCl	$11{,}8 \cdot 10^{-5}$
NaBr	$17{,}5 \cdot 10^{-5}$
NaJ	$33{,}6 \cdot 10^{-5}$
$Na_2S_2O_3$	$160{,}0 \cdot 10^{-5}$

Man sieht, daß die toxische Wirkung des $HgCl_2$ beim Kaninchen, durch die Gegenwart der verschiedenen Salze, und zwar in folgender Ordnung: $NaCl > NaBr > NaJ > Na_2S_2O_3$ abnimmt; in der gleichen Ordnung haben wir schon früher eine Abnahme der hämolytischen Tätigkeit angetroffen.

Will man die Minimalmenge Quecksilberchlorid pro Kaninchenblutkörperchen, die in Gegenwart der obenerwähnten Salze Hämolyse geben, und die Minimalmengen, die beim Kaninchen tödliche Wirkung haben, vergleichend gegenüberstellen, so muß man diese Mengen auf den Teil lebender Masse, auf den sie wirken, beziehen, und die Gegenüberstellung zwischen tödlicher Minimalmenge und Körpergewicht des Kaninchens (1000 g) einerseits, und zwischen hämolysierender

[1]) *Paul* und *Krönig*, Zeitschr. f. physik. Chem. **21**, 414. 1896; Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **25**, 1. 1897.

[2]) *Spiro* und *Scheuerlen*, Münch. med. Wochenschr. **81**. 1897.

[3]) *L. Sabbatani*, Arch. di antropol. crim. psichiatr. e med. **25**, 5—6. 1904.

[4]) *L. Sabbatani*, Arch. di Fisiol. **3**, 81. 1905.

Minimalmenge und Gewicht eines Blutkörperchens[1]) (g 69,84 · 10^{-12} ungefähr)[2]) andererseits, aufstellen. Die Ergebnisse dieser Vergleiche sind in Tabelle VII wiedergegeben.

Tabelle VII.

Giftwirkung des $HgCl_2$ auf das Kaninchen und auf die roten Kaninchenblutkörperchen.

Gemischt mit	Auf das Kaninchen: Tödliche Minimalmenge pro kg Körpergewicht g Äqu.	Auf das Kaninchen: Verhältnis D/M	Auf die roten Blutkörperchen: Hämolysier. Minimalm. pro Blutkörperchen g Äqu.	Auf die roten Blutkörperchen: Verhältnis D/M
a	b	c	d	e
NaCl	$11{,}8 \cdot 10^{-5}$	$11{,}8 \cdot 10^{-8}$	$45{,}7 \cdot 10^{-18}$	$65{,}6 \cdot 10^{-8}$
NaBr	$17{,}5 \cdot 10^{-5}$	$17{,}5 \cdot 10^{-8}$	$76{,}2 \cdot 10^{-18}$	$109{,}7 \cdot 10^{-8}$
NaJ	$33{,}6 \cdot 10^{-5}$	$33{,}6 \cdot 10^{-8}$	$254 \cdot 10^{-18}$	$365{,}0 \cdot 10^{-8}$
$Na_2S_2O_3$	$160 \cdot 10^{-5}$	$160 \cdot 10^{-8}$	$460 \cdot 10^{-18}$	$661{,}1 \cdot 10^{-8}$

Man ersieht aus den angeführten Zahlen, daß die niedrigsten Werte, die Hämolyse bewirken, trotz ihrer Kleinheit nichts Außergewöhnliches aufweisen, wenn man die organische Masse, auf die sie einwirken, in Betracht zieht. Die hämolysierenden Minimalmengen ergeben sich immer höher als die tödlichen Minimalmengen.

Außerdem will ich zuletzt auch erwähnen, wie *Salant* und *Kleitman*[3]) bei ihren Versuchen mit verschiedenen Quecksilbersalzen beim isolierten Froschherzen verschiedene Giftwirkungen erhielten, und zwar eine höhere für das $HgCl_2$, eine geringere für andere Salze (Benzoate u. a.). Ich glaube solche Ergebnisse mit Recht durch die verschiedene Dissoziabilität der Salze erklären zu können.

Aus dem bisher Gesagten geht hervor, daß die parallel mit ihrem Dissoziationsgrade verschiedene toxische Wirkung der Schwermetallsalze eine Allgemeinerscheinung ist, die aus ihrer Wirkung auf die Bakterien, auf die roten Blutkörperchen, auf das isolierte Froschherz und auch auf höhere Organismen, wie z. B. auf die Säugetiere, ersichtlich ist.

---

[1]) *L. Sabbatani* (Arch. di Scienze biol. **2**, 161; 1922) kam durch ein solches Vergleichen der von ihm festgestellten tödlichen Minimalmengen von $AgNO_3$ pro Kilogramm Kaninchengewicht und der von mir festgestellten hämolysierenden $AgNO_3$-Minimalmengen pro Blutkörperchen zu folgenden Werten: für das Kaninchen $16 \cdot 10^{-6}$, für Blutkörperchen $23 \cdot 10^{-6}$, und bestätigt dadurch die regelmäßige Gültigkeit der für das Blutkörperchen gefundenen Werte, die beim ersten Blick außerordentlich klein vorkommen können.

[2]) Dieses Mittelgewicht für das Kaninchenblutkörperchen geht aus eigenen Untersuchungen, die noch im Drucke sind, hervor.

[3]) *W. Salant* und *N. Kleitman*, Scientific Proc. of the Americ. soc. f. pharmac. and exp. therap. Twelfth Ann. Meet. Held at Chicago 1920.

4. Erscheinungen, die eine vermittelnde Stelle einnehmen zwischen Hämolyse und Koagulation.

a) Einfluß der Temperatur.

Man sah, daß die untersuchten Metallsalze bei zunehmender Konzentration ihre Wirkung auf die roten Blutkörperchen änderten. Sehr niedrige Konzentrationen lassen keine Veränderung der Blutkörperchen wahrnehmen; zunehmende bewirken Hämolyse; höhere Konzentrationen geben Koagulation bei gleichzeitiger Zerbröckelung und Auflösung der Blutkörperchen; bei noch höheren Konzentrationen tritt Koagulation und gute Erhaltung derselben ein; die höchsten Konzen-

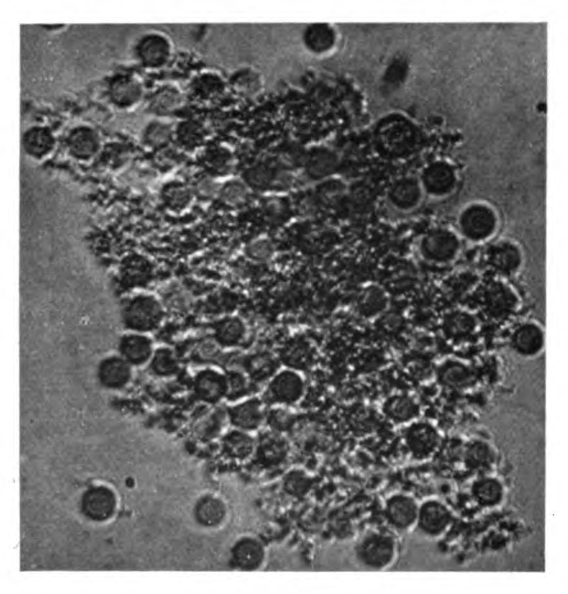


Abb. 3.

trationen, die gebraucht wurden, bewirkten Koagulation und entformten die Blutkörperchen. In Abb. 3—5 sind die Ergebnisse, die durch Behandlung der roten Blutkörperchen mit verschiedenen $PdCl_2$-Lösungen erhalten wurden, wiedergegeben; und zwar: Auflösung der Blutkörperchen in Abb. 3; gute Erhaltung in Abb. 4 und Deformation der Blutkörperchen in Abb. 5.

Bei jedem der 3 Versuche war der Niederschlag koaguliert, so daß die Überführung desselben in destilliertes Wasser keine Hämolyse zur Folge hatte. Bei noch so geringer Zunahme der Maximalkonzentration, die Hämolyse gibt, sieht man bei allen untersuchten Salzen irreversible Koagulation. Zur größeren Genauigkeit kann man sagen, daß der Niederschlag, auch bei den höchsten Konzentrationen, die partielle

Hämolyse geben, koaguliert erscheint. Bei den Untersuchungen, die ich früher[1]) erwähnt, bildet das $Pb(NO_3)_2$ und das $HgCl_2$ in dieser Be-

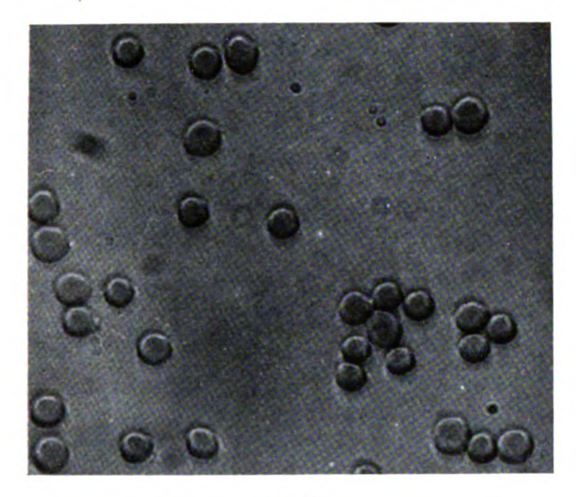


Abb. 4.

ziehung eine Ausnahme, bei diesen 2 Salzen gibt es zwischen den Maximal- und Minimalkonzentrationen, die Spuren von Hämolyse bzw. irreversible Koagulation geben, andere Zwischenkonzentrationen, bei

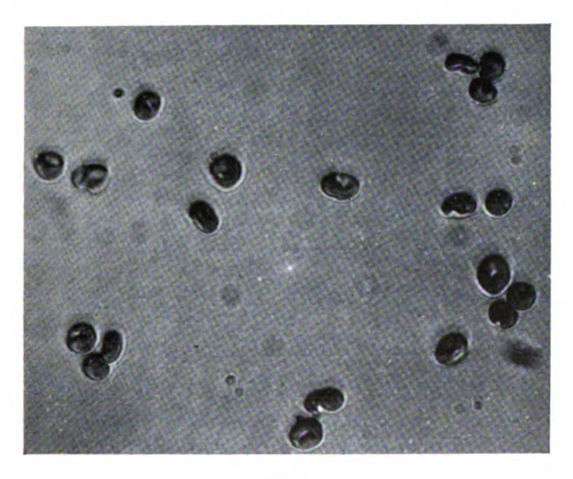


Abb. 5.

welchen die Überführung des Präcipitates in destilliertes Wasser eine langsame Hämolyse bewirkt.

[1]) *E. Meneghetti*, l. c.

Tabelle VIII.

Nr.	Reihe α (Temp. = +7° C)									Reihe β (Temp. = 37° C) Das übrige gleich wie in Reihe α		
	Versuch ausgeführt mit				Die Lösung enthält		Resultate nach 24 Stunden			Resultate nach 24 Stunden		
	$Pb(NO_3)_2$ g Äqu. pro Liter	ccm	1,875 g-pz. KNO_3-Lösung ccm	Blutkörperchenaufschwemm. ccm	$Pb(NO_3)_2$ g Äqu. pro l	$Pb(NO_3)_2$ g Äqu. pro Blutkörperchen	Makroskopischer Befund	Mikroskopischer Befund	Reversibilität in H_2O	Makroskopischer Befund	Mikroskopischer Befund	Reversibilität in H_2O
a	b	c	d	e	f	g	h	i	l	h′	i′	l′
1	$329{,}08 \cdot 10^{-4}$	1	9	0,2	$322 \cdot 10^{-5}$	$57{,}2 \cdot 10^{-15}$	+ + + +			+ + + +		
2	$329{,}08 \cdot 10^{-4}$	2	8	0,2	$645 \cdot 10^{-5}$	$11{,}4 \cdot 10^{-14}$	+ + + +			+ + + +		
3	$329{,}08 \cdot 10^{-4}$	3	7	0,2	$967 \cdot 10^{-5}$	$17{,}1 \cdot 10^{-14}$	+ + + +			+ + + +		
4	$329{,}08 \cdot 10^{-4}$	4	6	0,2	$129 \cdot 10^{-4}$	$22{,}8 \cdot 10^{-14}$	+ + + +			+ + + +		
5	$329{,}08 \cdot 10^{-4}$	5	5	0,2	$161 \cdot 10^{-4}$	$28{,}6 \cdot 10^{-14}$	+ + + +			+ +		
6	$329{,}08 \cdot 10^{-4}$	6	4	0,2	$193 \cdot 10^{-4}$	$34{,}3 \cdot 10^{-14}$	+ + +	gut erhaltene Blutkörperch. und Schatten	rasche, vollk. Reversibilit.	Spuren	unförmige Masse, agglutinierte, körnige Blutk.	irreversib.
7	$329{,}08 \cdot 10^{-4}$	7	3	0,2	$225 \cdot 10^{-4}$	$40{,}0 \cdot 10^{-14}$	+	dgl.	dgl.			,,
8	$329{,}08 \cdot 10^{-4}$	8	2	0,2	$258 \cdot 10^{-4}$	$45{,}7 \cdot 10^{-14}$	Spuren	,,	vollk., aber langsame Reversibilität			,,
9	$329{,}08 \cdot 10^{-4}$	9	1	0,2	$290 \cdot 10^{-4}$	$51{,}5 \cdot 10^{-14}$		gut erhaltene Blutkörperch. und Schatten	dgl.		dgl.	,,
10	$329{,}08 \cdot 10^{-4}$	10	—	0,2	$322 \cdot 10^{-4}$	$57{,}2 \cdot 10^{-14}$					,,	,,
11	$329{,}08 \cdot 10^{-3}$	2	8	0,2	$645 \cdot 10^{-4}$	$11{,}4 \cdot 10^{-13}$		dgl.	vollk., aber äußerst langs. Reversibilit.		,,	,,
12	$329{,}08 \cdot 10^{-3}$	3	7	0,2	$967 \cdot 10^{-4}$	$17{,}1 \cdot 10^{-13}$		,,			,,	,,
13	$329{,}08 \cdot 10^{-3}$	4	6	0,2	$129 \cdot 10^{-3}$	$22{,}8 \cdot 10^{-13}$		,,			körn., wenig agglutinierte Blutkörperch.	,,
14	$329{,}08 \cdot 10^{-3}$	5	5	0,2	$161 \cdot 10^{-3}$	$28{,}6 \cdot 10^{-13}$		,,	dgl.			,,
15	$329{,}08 \cdot 10^{-3}$	6	4	0,2	$193 \cdot 10^{-3}$	$34{,}3 \cdot 10^{-13}$		,,	,,		gut erhalt., rein körnige Blutkörperch.	,,
16	$329{,}08 \cdot 10^{-3}$	7	3	0,2	$225 \cdot 10^{-3}$	$40{,}0 \cdot 10^{-13}$		,,	,,			,,
17	$329{,}08 \cdot 10^{-3}$	8	2	0,2	$258 \cdot 10^{-3}$	$45{,}7 \cdot 10^{-13}$		,,	,,			,,
18	$329{,}08 \cdot 10^{-3}$	9	1	0,2	$290 \cdot 10^{-3}$	$51{,}5 \cdot 10^{-13}$		,,	,,		dgl.	,,
19	$329{,}08 \cdot 10^{-3}$	10	—	0,2	$322 \cdot 10^{-3}$	$57{,}2 \cdot 10^{-13}$		,,	,,		,,	,,

Aufschwemmung mit 2875000 Blutkörperchen pro cmm.

Tabelle IX.

Nr.	Reihe α (Temp. = 7° C)										Reihe β (Temp. = 37° C)		
	Versuch ausgeführt mit				Die Lösung enthält		Resultate nach 24 Stunden				Resultate nach 24 Stunden		
	$HgCl_2$ g Äqu. pro Liter	$HgCl_2$ ccm	1 g-prz. NaCl-Lös. ccm	Blutkörperchenaufschwemm. ccm	$HgCl_2$ g Äqu. pro Liter	$HgCl_2$ g Äqu. pro Blutkörperchen	Makroskop. Befund	Mikroskopischer Befund	Reversibilität in H_2O:		Makroskop. Befund	Mikroskopischer Befund	Reservibilit. i. H_2O:
a	b	c	d	e	f	g	h	i	l		h'	i'	l'
1	$736{,}64 \cdot 10^{-5}$	1	9	0,2	$722 \cdot 10^{-6}$	$13{,}7 \cdot 10^{-15}$	keine Spur Haem.	angeschw. etwas agglutin. Blutkörp.	vollkommene, langsame Reversibilität		+ +	unförm. Masse; wenige angeschwoll., unförmige Blutkörp.	irrev.
2	$736{,}64 \cdot 10^{-5}$	2	8	0,2	$144 \cdot 10^{-5}$	$27{,}5 \cdot 10^{-15}$	dgl.	dgl.	dgl.		+ + +	dgl.	"
3	$736{,}64 \cdot 10^{-5}$	3	7	0,2	$217 \cdot 10^{-5}$	$41{,}3 \cdot 10^{-15}$	"	"	"		+ +	"	"
4	$736{,}64 \cdot 10^{-5}$	4	6	0,2	$289 \cdot 10^{-5}$	$55{,}0 \cdot 10^{-15}$	"	"	"		+ +	"	"
5	$736{,}64 \cdot 10^{-5}$	5	5	0,2	$361 \cdot 10^{-5}$	$68{,}8 \cdot 10^{-15}$	"	"	"		+	unförmige Blutkörperch.; Blutkörperchensplitter	"
6	$736{,}64 \cdot 10^{-5}$	6	4	0,2	$433 \cdot 10^{-5}$	$82{,}6 \cdot 10^{-15}$	"	"	"		+ +	dgl.	"
7	$736{,}64 \cdot 10^{-5}$	7	3	0,2	$505 \cdot 10^{-5}$	$96{,}2 \cdot 10^{-15}$	"	"	"		+	"	"
8	$736{,}64 \cdot 10^{-5}$	8	2	0,2	$578 \cdot 10^{-5}$	$11{,}0 \cdot 10^{-14}$	"	"	"		+	"	"
9	$736{,}64 \cdot 10^{-5}$	9	1	0,2	$650 \cdot 10^{-5}$	$12{,}3 \cdot 10^{-14}$	"	"	vollkomm., äußerst langs. Reversibilität		+	"	"
10	$736{,}64 \cdot 10^{-5}$	10	—	0,2	$722 \cdot 10^{-5}$	$13{,}7 \cdot 10^{-14}$	"	"	dgl.		Spuren	leicht unförmige, angeschwoll. Blutkörp.	"
11	$736{,}64 \cdot 10^{-4}$	2	8	0,2	$144 \cdot 10^{-4}$	$27{,}5 \cdot 10^{-14}$	"	"	partielle, sehr langsame Reversibilität		minim. Spuren	dgl.	"
12	$736{,}64 \cdot 10^{-4}$	3	7	0,2	$217 \cdot 10^{-4}$	$41{,}3 \cdot 10^{-14}$	"	ziemlich gut erhalt., etwas angeschw. Blutkörperchen	dgl.			"	"
13	$736{,}64 \cdot 10^{-4}$	4	6	0,2	$289 \cdot 10^{-4}$	$55{,}0 \cdot 10^{-14}$	"	ziemlich gut erhalt. Blutkörperchen	Irreversibilität			gut erhaltene Blutkörperchen	"
14	$736{,}64 \cdot 10^{-4}$	5	5	0,2	$361 \cdot 10^{-4}$	$68{,}8 \cdot 10^{-14}$	"	dgl.	dgl.			dgl.	"
15	$736{,}64 \cdot 10^{-4}$	6	4	0,2	$433 \cdot 10^{-4}$	$82{,}6 \cdot 10^{-14}$	"	"	"			"	"
16	$736{,}64 \cdot 10^{-4}$	7	3	0,2	$505 \cdot 10^{-4}$	$96{,}2 \cdot 10^{-14}$	"	"	"			"	"
17	$736{,}64 \cdot 10^{-4}$	8	2	0,2	$578 \cdot 10^{-4}$	$11{,}0 \cdot 10^{-13}$	"	"	"			"	"
18	$736{,}64 \cdot 10^{-4}$	9	1	0,2	$650 \cdot 10^{-4}$	$12{,}3 \cdot 10^{-13}$	"	"	"			unförmige Blutkörperchen	"
19	$736{,}64 \cdot 10^{-4}$	10	—	0,2	$722 \cdot 10^{-4}$	$13{,}7 \cdot 10^{-13}$	"	"	"			dgl.	"

Aufschwemmung mit 2675000 Blutkörperchen pro ccm.

Die Untersuchungen, die zu solchen Ergebnissen führten, wurden, wie früher schon bei der Behandlung der Technik erwähnt wurde, im Thermostaten bei einer Temperatur von 20° angestellt. Bei Wiederholung der Versuche in einer Temperatur von 37° verschwindet der Zwischenraum zwischen hämolysierender Maximalkonzentration und koagulierender Minimalkonzentration, während dagegen derselbe zunimmt, wenn die Versuche in einer dauernden Temperatur von 7° (Eiskammer) stattfinden. In Tabelle VIII sind 2 mit $Pb(NO_3)_2$[1] in allem gleichmäßig angestellte Versuchsreihen angeführt, von denen die eine bei einer Temperatur von 7°, die andere bei einer Temperatur von 37° abläuft.

In der Tabelle IX sind 2 analoge Versuche, mit $HgCl_2$ angestellt, wiedergegeben.

Man ersieht also klar, wie das besondere, obenerwähnte Verhalten der 2 in Betracht gezogenen Salze von einer größeren Langsamkeit jener chemischen oder physikalisch-chemischen Prozesse, deren Ergebnisse die Hämolyse oder die Koagulation ist, abhängig ist, Prozesse, die sich für andere Salze ($AgNO_3$, $PdCl_2$ u. a.) rascher entwickeln. Wenn wir allerdings die bei einer Temperatur von 20° mit diesen letzten Salzen angestellten Untersuchungen bei einer Temperatur von 7° anstellen, so sieht man eine größere Trägheit in der Entwicklung der Erscheinungen und infolgedessen erscheint auch für diese Salze ein Intervall zwischen den Maximalmengen und Minimalmengen, die Hämolyse bzw. Koagulation geben.

Wir können deshalb im allgemeinen behaupten, daß sich die 2 Prozesse der Hämolyse und Koagulation mit verschiedener Geschwindigkeit je nach den verschiedenen Salzen und für dasselbe Salz je nach der verschiedenen Temperatur entwickeln.

b) Wie sich die hämolytischen und koagulierenden Wirkungen entwickeln und aufeinanderfolgen.

Es wurde erwähnt, wie für einige Zwischenkonzentrationen des metallischen Salzes, zwischen jenen, die die roten Blutkörperchen koagulieren und ihre Form erhalten, und zwischen jenen, die die Blutkörperchen hämolysieren, im allgemeinen als Endresultat eine Koagulation der zersplitterten Überreste der Blutkörperchen bemerkt wurde. Es scheint nun logisch, dieses Ergebnis der Aufeinanderfolge oder der gleichzeitigen Entwicklung von physikalisch-chemischen Prozessen, die durch die hämolytische oder durch die koagulierende Wirkung bedingt sind, zuzuschreiben. Wenn sich diese 2 Wirkungen endgültig vollkommen ausbilden können, so führen sie bestimmt zu ganz unter sich entgegengesetzten Ergebnissen; man begreift ebenfalls, wie durch besondere

[1]) $Pb(NO_3)_2$ 5,450 g-proz. $\Delta = 0{,}58$.

Konzentrationen, die eine Wirkung die Ausbildung der anderen beeinflussen und ein Endresultat geben kann, welches nicht einer vollkommenen Hämolyse oder einer vollkommenen Koagulation, sondern Erscheinungen verschiedener Ordnung zuzuschreiben ist; diese Erscheinungen teils zur Hämolyse, teils zur Koagulation neigend, haben sich gegenseitig beeinflußt oder in ihrer Entwicklung gehemmt.

Es schien mir notwendig, die Erscheinungen in ihrer Entwicklung und in ihrer Aufeinanderfolge für die Konzentrationen, die solche Ergebnisse geben und für Konzentrationen, die diesen nahestehen, eingehender ins Auge zu fassen. In der Tabelle X habe ich zu diesem Zwecke eine Reihe von Versuchen mit $AgNO_3$- in KNO_3-Lösung wiedergegeben.

Wie aus der Spalte h der Tabelle X in den Versuchen 3 und 4 hervorgeht, bemerkt man einige Minuten nach dem Zufügen von Blutkörperchen die Bildung der Hämolyse, die binnen 1—2 Minuten vollkommen wird. Es folgt aber unmittelbar eine fortschreitende Trübung der Flüssigkeit und die langsame Bildung eines schwarzgrauen Niederschlages. Mikroskopisch untersucht zeigte sich der Niederschlag aus unförmiger Masse gebildet. Diese Betrachtungen lassen deutlich ersehen, wie für jene Konzentrationen, bei welchen die Blutkörperchen mehr oder weniger aufgelöst erscheinen, dem Prozesse der Hämolyse (der nur anfänglich sein kann wie in den Versuchen 5—7 ohne eine deutliche, vollkommene Hämolyse bewirkt zu haben, oder der sich wie in Versuchen 3—4 vollkommen entwickelt hat) ein Prozeß deutlicher Koagulation gefolgt ist.

Auch in anderen Metallen kann man ausgezeichnet diese Aufeinanderfolge der Koagulation auf die Hämolyse wahrnehmen. So sieht man z. B. in den Versuchen 40—45 der Tabelle IV (Reihe β), bei welchen $HgCl_2$ in NaBr-Lösung angewendet wurde, eine rasche, vollkommene Hämolyse, auf welche sofort eine rasche Koagulation folgt. Außerdem macht sich in allen erwähnten Untersuchungen der Tabelle X, unabhängig vom Endresultat, kaum daß die roten Blutkörperchen in die $AgNO_3$-Lösung gegeben wurden, die Bildung von Prozessen, die zur Koagulation hinneigen, bemerkbar. Wenn wir eben sofort nach Zusatz der Blutkörperchen stark schütteln und 2 ccm dieses Gemenges in 8 ccm destillierten Wassers geben und dadurch eine entschieden isotonische Flüssigkeit erhalten, so bemerken wir, daß die Hämolyse nicht erscheint oder in einem späteren Zeitpunkte erscheint als der, in dem sie erscheinen müßte, wenn es sich um Blutkörperchen handeln würde, die vorher nicht der Wirkung des Metallsalzes ausgesetzt gewesen wären.

Es scheint deshalb die Folgerung berechtigt, daß auch für hämolysierende Konzentrationen die Prozesse, die sich zuerst entwickeln, zur Koagulation hinneigen.

Tabelle X.

Nr.	Versuch ausgeführt mit: $AgNO_3$ g Äqu. pro Liter	$AgNO_3$ ccm	1,875 g-proz. KNO_3-Lösung ccm	Blutkörperchenaufschw. ccm	Die Lösung enthält: $AgNO_3$ g Äqu. pro Liter	$AgNO_3$ g Äqu. pro Blutkörperchen	Resultate: Erscheinungen 1 Stunde nach Zutat der Blutkörperchen	nach 24 Stunden: Makroskopischer Befund	nach 24 Stunden: Mikroskopischer Befund
a	b	c	d	e	f	g	h	i	l
1	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	0,5	9,5	0,2	$86{,}5 \cdot 10^{-6}$	$20{,}6 \cdot 10^{-16}$	Unmittelbare Hämolyse	++++	
2	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	1	9	0,2	$173 \cdot 10^{-6}$	$41{,}3 \cdot 10^{-16}$	" "	++++	
3	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	1,5	8,5	0,2	$259 \cdot 10^{-6}$	$62{,}0 \cdot 10^{-16}$	Die Hämolyse erscheint ungefähr nach 1 Minute und bildet sich vollkommen aus. In der Folge entsteht Trübung und Bildung von Flocken, die sich am Grunde niederschlagen	Irreversible Koagulation ++	Unförm. Masse, Blutkörperchenschatten.
4	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	2	8	0,2	$346 \cdot 10^{-6}$	$82{,}7 \cdot 10^{-16}$	Die Hämolyse erscheint ungefähr nach 2 Minuten und bildet sich fast vollkommen aus. Sofort darauf entsteht Trübung der Flüssigkeit; sehr zahlreiche, sich am Grunde niederschlagende Flockenbildung	Irreversible Koagulation +	dgl.
5	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	2,5	7,5	0,2	$432 \cdot 10^{-6}$	$10{,}3 \cdot 10^{-15}$	Nichts Bemerkenswertes	Spuren von Hämolyse und irreversible Koagulation	dgl.
6	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	3	7	0,2	$519 \cdot 10^{-6}$	$12{,}4 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	dgl.
7	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	3,5	6,5	0,2	$605 \cdot 10^{-6}$	$14{,}4 \cdot 10^{-15}$	"	Irreversible Koagulation	dgl.
8	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	4	6	0,2	$692 \cdot 10^{-6}$	$16{,}5 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	dgl.
9	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	4,5	5,5	0,2	$778 \cdot 10^{-6}$	$18{,}6 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	dgl.

10	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	5	5	0,2	$865 \cdot 10^{-6}$	$20{,}6 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	Zahlreiche Blutkörperchen, unförmige Masse, spärliche Schatt.
11	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	5,5	4,5	0,2	$951 \cdot 10^{-6}$	$22{,}7 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	dgl.
12	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	6	4	0,2	$103 \cdot 10^{-5}$	$24{,}8 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	dgl.
13	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	6,5	3,5	0,2	$112 \cdot 10^{-5}$	$26{,}8 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	dgl.
14	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	7	3	0,2	$121 \cdot 10^{-5}$	$28{,}9 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	dgl.
15	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	7,5	2,5	0,2	$129 \cdot 10^{-5}$	$31{,}0 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	Zahlreiche Blutkörperchen, wenig unförmige Masse, wenig Schatten
16	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	8	2	0,2	$138 \cdot 10^{-5}$	$33{,}1 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	dgl.
17	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	8,5	1,5	0,2	$146 \cdot 10^{-5}$	$35{,}0 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	dgl.
18	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	9	1	0,2	$155 \cdot 10^{-5}$	$37{,}2 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	Guterhaltene, körnige Blutkörperchen
19	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	9,5	0,5	0,2	$164 \cdot 10^{-5}$	$39{,}3 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	dgl.
20	$176{,}47 \cdot 10^{-5}$	10	—	0,2	$173 \cdot 10^{-5}$	$41{,}3 \cdot 10^{-15}$	"	dgl.	dgl.

Aufschwemmung mit 2090620 Blutkörperchen pro ccm.

Der Beweis dafür bringt bei Untersuchungen mit $AgNO_3$ in KNO_3-Lösung manche Schwierigkeit mit sich, infolge der Eile, mit der sich die Hämolyse bildet: leichter wird dies bei Untersuchungen mit $AgNO_3$ in $Na_2S_2O_3$-Lösung oder $HgCl_2$ in NaCl-Lösung. Mit $HgCl_2$ in NaCl-Lösung hat eben *Bechhold*[1]) gezeigt, wie die fixierende Wirkung der hämolytischen vorausgehe.

Wir haben also in den Versuchen 3—7 der Tabelle X folgende Reihenfolge der Erscheinungen:

Reversible Koagulation → Hämolyse → irreversible Koagulation.

Wenn wir die auf die Hämolyse unmittelbar darauffolgende Koagulation ohne weiteres als eine Weiterbildung und Ergänzung des früher begonnenen Koagulationsprozesses betrachten möchten, so würden wir wahrscheinlich einen übertrieben einfachen Standpunkt vertreten, weil wir eben den physikalisch-chemischen Zustand der Blutkörperchenkomponenten vor der Hämolyse mit dem der infolge Auflösung der Blutkörperchen schon in Lösung übergegangenen Komponenten identifizieren würden. Im Grunde genommen kann man jedoch die Erscheinungen als gleich ansehen.

Tatsächlich habe ich anstatt rote Blutkörperchen in einer Reihe von Untersuchungen, die ich der Kürze halber nicht vor-

[1]) *H. Bechhold* l. c.

bringe, dieselbe Blutkörperchenmenge hämolysiert in 5 ccm destillierten Wassers, der ich noch 5 ccm $AgNO_3$-Lösung in verschiedener Konzentration in 3,75 g-proz. KNO_3-Lösung zufügte, gebraucht. Auf diese Weise erhielt man für jede Untersuchung dieselben $AgNO_3$- und KNO_3-Konzentrationen wie in der Tabelle X. Die makroskopischen Ergebnisse nach 24 Stunden waren im Grunde gleich denen, die ich in der genannten Tabelle erwähnt habe. Und wenn man noch bei den Versuchen 1–2 der Tabelle X $AgNO_3$ hinzufügt und auf diese Weise die gesamte Konzentration auf den Konzentrationswert eines folgenden Versuches bringt, so bemerkt man eine rasche Trübung und Niederschlagsbildung. Wir können demnach folgern, daß die unmittelbar der Hämolyse vorausgehende Koagulation ein Prozeß derselben Ordnung sei wie der, der auf die Hämolyse folgenden Koagulation.

Betrachten wir nun, wie sich der Koagulationsprozeß in den auf Versuch 4 folgenden Untersuchungen entwickelt; Untersuchungen, in denen nie die Bildung einer vollkommenen Hämolyse bemerkt wird. Nach Herstellung der Blutkörperchenmischung wurden in verschiedenen Zeitabschnitten 2 ccm von jedem dieser Ansätze genommen und 8 ccm destillierten Wassers zugefügt; die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

Tabelle Xa (nach 1 Minute).

Nr.	Resultate		
	nach 5 Min.	nach 15 Min.	nach 60 Min.
5a	+ + + +	+ + + +	+ + + +
6a	+ + + +	+ + + +	+ + + +
7a	+ + + +	+ + + +	+ + + +
8a	+ + + +	+ + + +	+ + + +
9a	+ +	+ + + +	+ + + +
10a	+ +	+ + + +	+ + + +
11a	+	+ + + +	+ + + +
12a		+	+ + + +

In keinem Versuche erhält man unmittelbare Hämolyse; auch in Versuch 5a erscheint die Hämolyse ungefähr nach 3 bis 4 Minuten.

Tabelle Xb (nach 15 Minuten).

Nr.	Resultate		
	nach 5 Min.	nach 45 Min.	nach 8 Stdn.
5b	+ + +	+ + + +	+ + + +
6b	+ + +	+ + + +	+ + + +
7b	+ + +	+ + + +	+ + + +
8b	+	+ + +	+ + + +
9b		+	+ + + +
10b		Spurchen	+ + + +
11b		"	+ + + +
12b			

Tabelle Xc (nach 60 Minuten).

Nr.	Resultate		
	nach 5 Min.	nach 8 Stdn.	nach 24 Stdn.
5c	keine Spur	+	++
6c	" "	Spur	++
7c	" "	"	+
8c	" "		+
9c	" "		Spur
10c	" "		
11c	" "		
12c	" "		

Tabelle Xd (nach 180 Minuten).

Nr.	nach 24 Stunden
5d	keine Spur
6d	" "
7d	" "
8d	" "
9d	" "
10d	" "
11d	" "
12d	" "

Die Prüfung der Ergebnisse ergibt, daß die Koagulation mit dem Fortschreiten der Zeit und mit Zunehmen der Konzentration immer mehr hervortritt; und während sie bei höchsten Konzentrationen unmittelbar erscheint, ist sie für niedrigere Konzentrationen fortschreitend und träger. Aus dem, was bisher dargelegt wurde, kann man schließen, daß in dem Augenblicke, wo die roten Blutkörperchen mit einer $AgNO_3$-Lösung oder mit einer anderen Metallsalzlösung in Mischung gebracht werden, im allgemeinen (ausgenommen, wo es sich um so geringe Konzentrationen handeln könnte, die überhaupt keine wahrnehmbare Alteration bewirken) ein Koagulationsprozeß beginnt. Dieser Prozeß geht bei den höchsten Konzentrationen, die untersucht wurden, äußerst rasch vor sich und führt sofort zu scharfer Koagulation und Deformation der Blutkörperchen (Abb. 5). Bei nicht zu hohen Konzentrationen ist er wohl noch rasch, bewirkt aber keine Deformation (Abb. 4); bei niedrigeren Konzentrationen geht er langsam vor sich und wird dabei von einem Hämolyseprozesse unterbrochen, weswegen als Endresultat Koagulation von unförmlicher Masse und Blutkörperchensplitter stattfindet (Abb. 3); noch niedrigere Konzentrationen gestalten den Prozeß sehr langsam, so daß nach erlangter Hämolyse, die Koagulation, wenigstens bei unseren obenerwähnten Versuchsbedingungen, bei einfacher Betrachtung nicht zu sehen ist.

Tabelle XI.

Nr.	1,875 g-proz. KNO_3-Lösung ccm	0,8 g-proz. $AgNO_3$-Lösung in 1,875 g-proz. KNO_3-Lösung ccm	Blutkörperchen-aufschwemmung ccm	$AgNO_3$ g Äqu. pro Liter	Reihe α (Zimmertemperatur) Resultate nach 5 Minuten	nach 3 Stunden	nach 10 Stunden	Reihe β (Temperatur 25° C) Resultate nach 5 Minuten	nach 3 Stunden	nach 10 Stunden
a	b	c	d	e	f	g	h	f′	g′	h′
1	18,50	1,50	2	$12{,}0 \cdot 10^{-4}$	++++	++++	++++	++++	++++	++++
2	18,25	1,75	2	$14{,}0 \cdot 10^{-4}$	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	18,00	2,00	2	$16{,}0 \cdot 10^{-4}$	++++	++++	++++	++++	+++ (irrev. Koag.)	++ (irrev. Koag.)
4	17,75	2,25	2	$18{,}0 \cdot 10^{-4}$	++++	++++	++++	++++	++ (irrev. Koag.)	++ (irrev. Koag.)
5	17,50	2,50	2	$20{,}0 \cdot 10^{-4}$	++++	++++	++ (irrev. Koag.)	++++	++ (irrev. Koag.)	+ (irrev. Koag.)
6	17,25	2,75	2	$22{,}0 \cdot 10^{-4}$	++++	++ (irrev. Koag.)	++ (irrev. Koag.)	++++	++ (irrev. Koag.)	++ (irrev. Koag.)
7	17,00	3,00	2	$24{,}0 \cdot 10^{-4}$	++++	++ (irrev. Koag.)	+ (irrev. Koag.)	++++	Spur (irrev. Koag.)	Spur (irrev. Koag.)
8	16,00	4,00	2	$32{,}0 \cdot 10^{-4}$	?	Spur (irrev. Koag.)	Spur (irrev. Koag.)	?	"	"
9	15,00	5,00	2	$40{,}1 \cdot 10^{-4}$	?	" (irrev. Koag.)	" (irrev. Koag.)	?		
10	14,00	6,00	2	$48{,}1 \cdot 10^{-4}$	?			?		

Wenn jedoch die Untersuchungen bei einer höheren Temperatur vorgenommen werden, so ist es möglich, auch mit einigen dieser Konzentrationen eine Niederschlagbildung wahrzunehmen. Und dies geht aus der folgenden Tabelle hervor, in welcher 2 Versuchsreihen angeführt sind, die in allem identisch sind außer in der Temperatur, die für Reihe α die Zimmertemperatur war, für die Reihe β im Thermostaten 25° C betrug.

Es geht aus dieser Tabelle hervor, wie in einem ersten Zeitpunkte in den Versuchen 1—7 sowohl bei Zimmertemperatur wie auch bei 25° C vollkommene Hämolyse stattfindet. In der Folge bildet sich bei Zimmertemperatur ein Niederschlag in den Versuchen 5—7; bei 25° C bildet sich dieser Niederschlag nicht nur in Versuchen 5—7, sondern auch in 3 und 4. Wir können dennoch folgern, daß sich in den Versuchen 3—4 auch bei Zimmertemperatur Prozesse entwickeln, die zur Koagulation hinneigen, jedoch in solch träger Form, die in der Mischung keine makroskopische Veränderung wahrnehmen läßt.

In Wahrheit stellt die Koagulation einer kolloidalen Lösung das Endresultat und das handgreiflichste Resultat eines Aggregationsprozesses

der kolloidalen Teilchen dar, aus dem die Bildung fortschreitend höherer molekularer Komplexe hervorgeht; wenn allerdings die Koagulation nicht wahrgenommen wird, so ist das doch kein hinreichender Grund, die Bildung jenes Prozesses auszuschließen. Denn es ist manchmal sogar möglich, mit bestimmten Mitteln das Gegenteil zu beweisen. Denn es ist bekannt[1]), wie in einer kolloidalen Lösung, die sich, sei es durch Wirkung der Wärme, sei es durch Wirkung besonderer niederschlagbildender Reagentien nahe dem kritischen Koagulationswerte befindet, auch bevor noch irgendwelche makroskopische Veränderung des Kolloides ein Anfang des Überganges vom Hydrosol in Hydrogel beweist, die Bildung größerer molekularer Komplexe stattfindet, welche Bildung sich im Zunehmen der Viscosität der Lösung offenbart.

Ich habe deswegen den Wert der Viscosität für einige Untersuchungen, bei welchen man Hämolyse ohne darauffolgende Koagulation wahrnimmt, bestimmt. Für diese viscosimetrischen Bestimmungen habe ich für jede Untersuchung eine ansehnliche Menge Blutkörperchenaufschwemmung gebraucht, um die etwaigen Viscositätsunterschiede um so auffallender betrachten zu können. Die Blutkörperchenaufschwemmung wurde in 1,875 g-proz. KNO_3-Lösung erhalten. Nach Zubereitung einer 3 g-proz. ($\Delta = 0{,}58$) $AgNO_3$-Lösung verdünnte ich diese verschieden mit einer 1,875 g-proz. KNO_3-Lösung und erhielt so isotonische Lösungen mit verschiedenen $AgNO_3$-Konzentrationen. Einer Menge von 10 ccm Blutkörperchenaufschwemmung wurden 10 ccm einer von diesen Lösungen[2]) hinzugefügt. Die verschiedenen Versuche wurden sofort im Thermostaten bei 25° angestellt, und nach 10 Stunden wurde nach den Ergebnissen nachgeschaut; für die Versuche, die keine Niederschlagsbildung ergaben, wurde die Viscosität bestimmt. Das für die viscosimetrische Bestimmung angewandte Volumen betrug 3 ccm. Der entsprechende Viscositätskoeffizient wurde nach der bekannten Formel:

$$\eta = \frac{dt}{d_0 t_0}$$

ausgerechnet.

Der Wert für d betrug 1,011[3]).

---

[1]) *A. Mayer*, Compt. rend. de la soc. de biol. **54**, 367; 1902; *W. Henri*, *S. Lalou*, *A. Mayer* und *G. Stodel*, Compt. rend. de la soc. de biol. **55**, 1668. 1903.

[2]) Die Art und Weise, mit der die Mischung vorgenommen wird, ist von großer Wichtigkeit. Bekanntlich kann man ja sehr verschiedene Resultate auch bei Benutzung gleicher Mengen Blutes und gleicher Mengen hämolysierenden Mittels erhalten, je nachdem diese dem Blute oder das Blut jenen hinzugefügt wird. (*Hans-Koeppe*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **103**, 104. 1904.)

[3]) Man stellte den Wert für d dadurch fest, daß man die Dichte einer durch Hämolysieren von 10 ccm Blutkörperchenaufschwemmung mit 7 ccm destillierten Wassers und KNO_3-Lösung erhaltenen und mit destilliertem Wasser auf 20 g gebrachten Mischung bestimmte. Auf diese Weise betrug die Schlußkonzentration des KNO_3 1,875 g-proz. ($\Delta = 0{,}58$).

Der Wert für t_0 betrug 1′ 14,2″. Die Untersuchungen sind in Tabelle XII zusammengefaßt.

Tabelle XII.

Nr.	Versuch ausgeführt mit			$AgNO_3$ g Äqu. pro Liter	Resultate nach 10 Stunden	
	Blutkörperchenaufschwemm.	1,875 g-proz. KNO_3-Lösung ccm	8 proz. $AgNO_3$-Lösung ccm		Makroskopisch. Befund	η
a	b	c	d	e	f	g
1	10	9,6	0,4	$35,2 \cdot 10^{-4}$	+ + + +	1,997
2	10	9,4	0,6	$52,0 \cdot 10^{-4}$	+ + + +	2,009
3	10	9,2	0,8	$70,5 \cdot 10^{-4}$	+ + + +	1,991
4	10	9	1,0	$88,2 \cdot 10^{-4}$	+ + + +	2,388
5	10	8,8	1,2	$10,5 \cdot 10^{-3}$	+ + + +	2,697
6	10	8,6	1,4	$12,3 \cdot 10^{-3}$	+ + } irrev. Koag.	
7	10	8,4	1,6	$14,1 \cdot 10^{-3}$	+ +	
8	10	8,2	1,8	$15,8 \cdot 10^{-3}$	+	

Man sieht aus den angegebenen Werten, wie es möglich ist, mit der viscosimetrischen Methode für einige Konzentrationen, die, obwohl noch so nahe den koagulierenden, dennoch keine Koagulation geben, Veränderungen derselben Ordnungsreihe wie diejenigen, die Koagulation bewirken, im physikalischen Zustande der Blutkörperchenkolloide zu bestimmen. Für niedrigere Konzentrationen genügt auch die viscosimetrische Methode zur Feststellung von derartigen Prozessen nicht mehr.

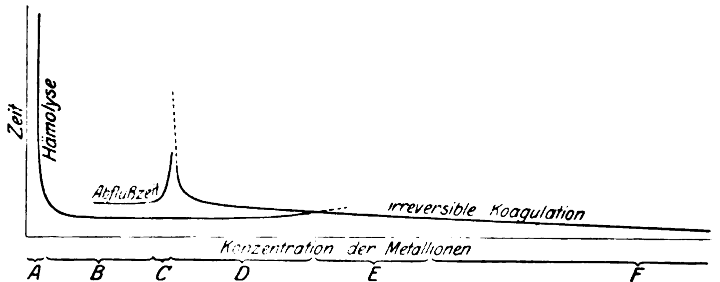


Abb. 6. *A* = keine wahrnehmbare Veränderung. *B* = Hämolyse. *C* = Hämolyse. Die Flüssigkeit besitzt größere Viscosität als in *B*. *D* = Auflösung und Koagulation. *E* = Koagulation und gute Erhaltung. *F* = Koagulation und Deformation.

Aus dem, was bisher besprochen wurde, glaube ich zusammenfassend graphisch darstellen zu können, wie sich im Verhältnisse zur Zeit und zur Menge der Metallionen pro Blutkörperchen die Ergebnisse ändern. Dies geht aus der vorstehenden Abbildung deutlich hervor.

5. Koagulation.

a) Ionische Konzentration und koagulierende Tätigkeit.

Daß in den untersuchten Metallsalzlösungen der chemische Erreger der Koagulation der Blutkörperchen das Kation • sei, wird von der

Tatsache bewiesen, daß auch die koagulierende Tätigkeit, was wir früher auch für die hämolytische gesehen haben, sich parallel mit der Ionenkonzentration ändert. Und in Wahrheit entspricht einer Zurückdrängung des elektrolytischen Dissoziationsgrades auch eine Abnahme der koagulierenden Tätigkeit; man bemerkt auch, daß unter den verschiedenen Metallverbindungen, die meistionisierten die wirksamsten sind.

Was die Wirkung der Zurückdrängung anbelangt, so will ich darüber bloß die mit $HgCl_2$ schon berichteten Untersuchungen der Tabelle IV erwähnen. Es geht aus jenen Versuchen hervor, daß auch die koagulierende Tätigkeit des Sublimats, wie die hämolytische und wie auch die antiseptische und die tödliche Wirkung auf die Kaninchen, in Gegenwart von NaCl, NaBr, NaJ verschieden ist; und zwar ändert sie sich in folgender Ordnung: NaCl $>$ NaBr $>$ NaJ, in welcher Ordnung sich eben auch der Konzentrationsgrad der Hg-Ionen ändert. Auch andere Untersuchungen mit anderen Metallsalzen (Pb, Cu u. a.), die ich nicht erwähne, um überflüssige Wiederholungen zu verhüten, zeigen, daß der parallele Verlauf zwischen koagulierender Wirkung und ionischer Konzentration eine bei allen Metallen vorkommende Erscheinung ist.

Im allgemeinen können wir sagen, daß, wenn nach stattgefundener Bestimmung der koagulierenden und hämolysierenden Minimalwerte eines Salzes eine Zurückdrängung des elektrolytischen Dissoziationsgrades bewirkt wird, man für den früher hämolysierenden Minimalwert keine besondere Alteration der roten Blutkörperchen bemerkt und daß der früher koagulierende Minimalwert dagegen Hämolyse bewirkt.

Was die koagulierende Wirkung der verschiedenen Verbindungen eines Metalles anbelangt, erwähne ich bloß *Bechholds*[1]) Untersuchungen mit verschiedenen Hg-Verbindungen, die ich vorher kurz erwähnt habe.

Das, was bis jetzt gesagt wurde, beweist deutlich, wie man bei Untersuchungen mit wenig ionisierten Metallverbindungen oder mit kolloidalen Metallen[2]) in Pulver- oder Blattform im Verhältnisse zur schwachen

---

[1]) *H. Bechhold* l. c.

[2]) Das Vorhandensein oder Fehlen der hämolytischen Tätigkeit bei den Metallen in kolloidalem Zustande muß, wie ich in der erwähnten Arbeit gesagt habe, auf die verschiedene Löslichkeit der Metalle zurückgeführt werden. Die Arbeiten des *Traube-Mengarini* und *Scala* (Kolloid-Zeitschr. **6**, 63; 1910; ibid. **6**, 240; 1910) beweisen, daß, während das Pb in kaltem Wasser, das Ag dagegen nur in siedendem Wasser löslich ist, das Pt auch in siedendem Wasser außerordentlich wenig löslich ist. Für Palladium und Gold kann man eine gleiche oder eine noch niedrigere Löslichkeit als die des Platins annehmen. Oben haben wir gesehen, wie das kolloidale Blei und Silber hämolytisch sind und wie dagegen das Platin, Palladium und Gold (*Ascoli, Novello, Preti*) nicht diese Eigenschaft besitzen. Auch *Le Fèvre* und *Aric* (Compt. rend. de la soc. de biol. 1919) haben unlängst bei zu anderen Zwecken angestellten Untersuchen mit kolloidalen Metallen auf Kaninchen- und Meer-

ionischen Konzentration nur Hämolyse und nicht mehr Koagulation haben kann [Metallisches und kolloidales Silber und Quecksilber — *Ascoli* und *Novello*[1]); kolloidales Blei nur in Pulverform — *Preti*[2]); Silber, Kupfer, Eisen, Blei, in Pulverform — *Fedeli*[3])], oder wie auch die Hämolyse fehlen kann [Kolloidales Gold, Platin, Palladium — *Ascoli* und *Novello*].

b) Aussehen der mit verschiedenen Metallsalzen fixierten Blutkörperchen.

Bei makroskopischer Prüfung der fixierten und am Grunde der Probegläschen gelagerten Blutkörperchen fällt sofort der Unterschied der Färbung auf. Die mit Zn-Salzen fixierten Blutkörperchen sind in ihrer Färbung den nichtfixierten fast ganz gleich; die mit Eisen fixierten zeigen eine rostähnliche gelbrote Färbung; mit Kobalt und Nickel eine bernsteingraue; mit Blei eine graue, mit Kupfer eine dunkelgrüne, mit Quecksilber eine graue, mit Silber eine schwarzgraue, mit Platin eine dunkelrote, mit Palladium eine dunkle Nußfarbe und mit Gold eine schwarze Färbung. Auch die mikroskopische Untersuchung weist Unterschiede auf; mit Fe-, Co-, Ni-, Cu-, Pb-, Ag- und Au-Salzen nehmen die Blutkörperchen ein entschieden körniges Aussehen an. In Abb. 7 sind mit H_2PtCl_2 fixierte Blutkörperchen dargestellt. Dagegen bemerkt man bei Blutkörperchen, die mit $HgCl_2$ und $PdCl_2$ (siehe Abb. 4) fixiert sind, gar nicht ein solches körniges Aussehen.

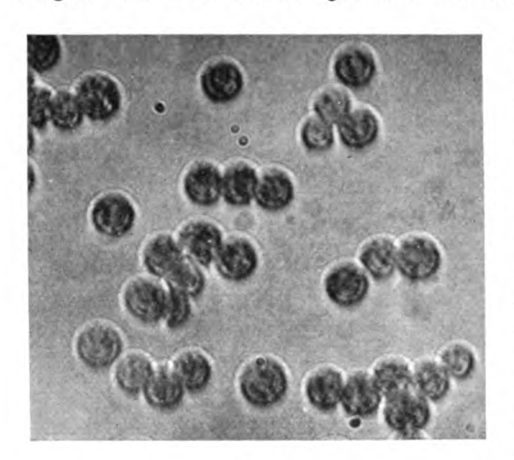


Abb. 7.

Bei nicht zu starker Vergrößerung erscheint manchmal das körnige Aussehen durch die Gegenwart wirklicher Granulationen, die sich

schweinchenblutkörperchen Hämolyse mit kolloidalem Ag, Spuren davon mit Pt, keine Hämolyse mit Gold bemerkt. Dieses Verhältnis zwischen hämolytischer Wirkung und Löslichkeit beweist eben, wie die kolloidalen Metalle nur beim Übergange von der Dispersionsphase in die Lösungsphase wirksam sind. Dies stimmt vollkommen mit dem, was in einer früheren Arbeit für andere anorganische Kolloide bewiesen wurde, überein (*E. Meneghetti*, diese Zeitschr. **121**, 1. 1921).

[1]) *M. Ascoli* und *F. Novello*, Compt. rend. de la soc. de biol. **64**, 724. 1908; ibid. **65**, 59; 1908; ibid. **65**, 138. 1908.

[2]) *L. Preti*, Compt. rend. de la soc. de biol. **65**, 52. 1908.

[3]) *A. Fedeli*, Arch. di farmacol. sperim. e scienze aff. **22**, 184; 1916; ibid. **22**, 199. 1916.

mitten im Protoplasma befinden, bedingt zu sein. Wenn man jedoch zu sehr starken Vergrößerungen greift, so sieht man, wie das körnige Aussehen der Bildung von Rauhigkeiten auf der ganzen Blutkörperchenoberfläche zuzuschreiben ist. Bei starken Vergrößerungen bemerkt man auch, daß die rauhen Blutkörperchen eine diskoidale, die ebenen dagegen eine sphärische Form besitzen. In Abb. 8 sind Blutkörperchen, die mit $CuSO_4$ fixiert wurden, in Abb. 9 solche, die mit $HgCl_2$ fixiert wurden, dargestellt.

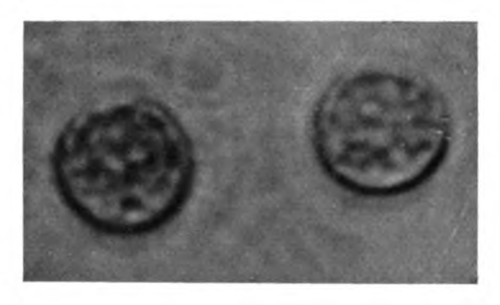


Abb. 8.

Was für einer chemischen oder physikalisch-chemischen Ursache die besondere, durch Hg und Pd bewirkte Koagulationsart der Globularkolloide, die sich mit einem besonderen, von dem der mit anderen Metallsalzen fixierten Blutkörperchen verschiedenen histologischen Aussehen kundgibt, zuzuschreiben ist, ist nicht leicht zu beweisen.

Was das $HgCl_2$ anbelangt, könnten wir denken, daß die bemerkte Erscheinung der bekannten Eigenschaft dieses Salzes, sich in den Lipoiden zu lösen, zugeschrieben werden könne[1]).

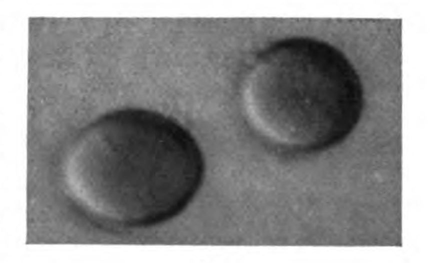


Abb. 9.

Für das $PdCl_2$ habe ich in der Literatur keine Untersuchungen über seine Wirkung auf Lipoide vorgefunden; deshalb habe ich mich an die von den erwähnten Autoren angegebene Methode zur Erhaltung feiner Lecithinsuspensionen gehalten und feststellen können, daß die niederschlagbildende Wirkung des $PdCl_2$ ungefähr der des $AgNO_3$ und des $HAuCl_4$ entspreche[2]).

---

[1]) *D. Porges* und *E. Neubauer*, Dies. Zeitschr. **7**, 152. 1908.

[2]) In diesen Untersuchungen wurde eine Tatsache bemerkt, die ein Interesse auch für die Interpretation der von den mit $HAuCl_4$ und $PdCl_2$ behandelten Blutkörperchen angenommene Färbung (die wir schon erwähnt) haben kann. Die Lecithinsuspension bildet mit $AgNO_3$ sehr rasch einen Niederschlag, langsamer dagegen mit Gold- und Palladiumsalzen. Wird eine Mischung von Lecithinsuspension mit einer $HAuCl_4$-Lösung hergestellt, so geht die gelbe Färbung der Mischung nach und nach ins Violette und schließlich in ein sanftes Blau über; es beginnt dann die Niederschlagbildung, und auch die amorphe Substanz die sich niedergelegt, besitzt dieselbe Färbung. Es scheint sehr wahrscheinlich, daß durch einen Reduktions-

Scheinbar dürfte also das besondere histologische Aussehen der mit $HgCl_2$ und $PdCl_2$ fixierten Blutkörperchen nicht einem besonderen Benehmen dieser Salze gegenüber den Globularlipoiden zuzuschreiben sein. Vielleicht könnte man dafür eine Erklärung finden, wenn man bedenkt, daß die Koagulation mehr oder weniger rasch stattfinden und auch in ihrem mikroskopischen Aussehen verschieden sein kann, je nach der spezifischen koagulierenden Tätigkeit der verschiedenen Metallkationen und auch je nach der verschiedenen Konzentration der auf die Blutkörperchen wirkenden Kationen.

Bedenken wir auch, daß das $PdCl_2$ und das $HgCl_2$ in NaCl-Lösung vollkommen entsprechende Anionenkomplexe bilden, $PdCl_4''$ und $HgCl_4''$, weswegen die Konzentration der $Pd^{\cdot\cdot}$ und $Hg^{\cdot\cdot}$ immer als verhältnismäßig schwach betrachtet werden muß. So werden wir z. B. in einer Lösung von $HgCl_2$ in NaCl ein sehr komplexes Gleichgewicht haben[1]: $2\,NaCl + HgCl_2 \rightleftarrows Na_2HgCl_4 \rightleftarrows 2\,Na + HgCl'' \rightleftarrows 2\,Na^{\cdot} + Hg^{\cdot\cdot} + 4\,Cl'$. Wahrscheinlich bildet sich der Koagulationsprozeß durch die Hg-Ionen infolge einer fortschreitenden Verschiebung des Gleichgewichtes nach rechts durch Bildung von Verbindungen oder von organisch-metallischen Adsorptionsprodukten.

Das besondere histologische Aussehen der mit $PdCl_2$ und $HgCl_2$ fixierten Blutkörperchen muß vielleicht einer besonderen Modalität im Koagulationsprozesse zuerteilt werden, im Verhältnisse eben zur schwachen Konzentration der $Hg^{\cdot\cdot}$ und $Pd^{\cdot\cdot}$ und im Verhältnisse zur Schwierigkeit, mit der die früher angenommene Verschiebung des Gleichgewichtes vor sich geht.

c) Reversibilität der Koagulation.

Wenn die Blutkörperchen, die unter der Wirkung eines der untersuchten Metallsalze gestanden sind, in destilliertem Wasser nicht mehr Hämolyse geben, so sprechen wir von irreversibler Koagulation. Um sich jedoch genau auszudrücken, muß man „nichtreversible Koagulation durch destilliertes Wasser“ sagen, weil es irrig wäre, von Irreversibilität in absolutem Sinne zu reden. Und das wird durch die folgenden Untersuchungen bewiesen.

Rote Blutkörperchen werden mit 1 g-proz. $HgCl_2$-Lösungen in 1 g-proz. NaCl-Lösung fixiert, darauf wiederholt in destilliertem Wasser ge-

prozeß kolloidales Gold gebildet wird, dessen Teilchen die Lecithinkörnchen vergolden. Ein analoger Vergoldungsprozeß wurde in der Kolloid-Chemie zur Messung von Amikronen einiger Kolloide angewendet (*G. Börjeson*, Kolloid-Zeitschr. **27**, 18; 1920). Auch mit dem $PdCl_2$ bemerkt man eine gleiche Aufeinanderfolge der Erscheinungen; die Mischung geht von der gelben Farbe in eine immer dunklere Nußfarbe über, und zuletzt bildet sich ein Niederschlag mit dieser Färbung.

[1]) Die schon erwähnten Nachforschungen von *Sherril* zeigen, daß das Gleichgewicht durch die Gegenwart anderer Zwischenverbindungen noch komplexer ist.

waschen. Es findet durchaus keine Hämolyse statt und man bekommt eine Blutkörperchenaufschwemmung mit 1 500 000 Blutkörperchen pro Kubikmillimeter. Dann werden 2 gleichkonzentrierte NaJ-Lösungen bereitet; die erste durch Mischung verschiedener Mengen 3,1 g-proz. NaJ-Lösung (isotonische) mit destilliertem Wasser, die zweite durch Mischung gleicher Mengen NaJ- und 1 g-proz. NaCl-Lösung. Jeder Lösung wurden 0,2 ccm Blutkörperchenaufschwemmung hinzugefügt. Ergebnisse und numerische Daten sind in der Tabelle XIII zusammengefaßt.

Tabelle XIII.

Reihe α				Reihe β			
Versuch angestellt mit			Resultate	Versuch angestellt mit			Resultate
…o …n	3,1 g-proz. NaJ-Lösung ccm	Fixiert. Blutkörperchenaufschwemm. ccm		1 g-proz. NaCl-Lösung ccm	3,1 g-proz. NaJ-Lösung ccm	Fixiert. Blutkörperchenaufschwemm. ccm	
[illegible]	b	c	d	a′	b′	c′	d′
	2	0,2	vollkommene, rasch., anhaltend. Hämolyse	8	2	0,2	vollkommene Hämolyse, Trübung u. Niederschlagbildung
	1	0,2	dgl.	9	1	0,2	dgl.
.5	0,5	0,2	vollkommene, anhaltende Hämolyse	9,5	0,5	0,2	"
.8	0,2	0,2	vollkommene, langsame, anhaltende Hämol.	9,2	0,2	0,2	minimale Spuren von Hämolyse

Die Erklärung der Ergebnisse ist leicht ersichtlich. Durch die Gegenwart von NaJ bildet sich wahrscheinlich in dem mit $HgCl_2$ fixierten Blutkörperchen ein Komplexsalz, und zwar eine Abnahme der Hg-Ionenkonzentration. Fehlt die zur Koagulationsbildung genügende Konzentration, so hat man Hämolyse. Diese hängt nicht von der Hypotonie der Lösung ab, weil sie auch in Gegenwart von NaJ in isotonischer NaCl-Lösung stattfindet. In diesem Falle bewirkt die Gegenwart des NaJ auch eine Abnahme der Hg. wie in dem früheren Falle; es handelt sich aber jedenfalls um eine weniger empfindliche Abnahme infolge gleichzeitiger Anwesenheit von Chlormercuraten.

Wahrscheinlich gelangt man zu den Hg.-Konzentrationen, die früher Hämolyse und dann Koagulation bewirken, wie früher beim Behandeln der Zwischenkonzentrationen, die zwischen den hämolysierenden und den koagulierenden stehen, bemerkt wurde.

Wir haben vorher gezeigt, wie die Hämolyse auf einen langsamen Koagulationsprozeß, der auch nach der Hämolyse fortdauern kann, folgt. Wenn dagegen die Koagulation rasch und energisch vor sich geht,

erscheint keine Hämolyse. Allerdings zeigen die Untersuchungen der Tabelle XIII, daß, wenn es uns gelingt, aus den fixierten Blutkörperchen einen Teil des koagulierenden Ions zu entfernen, die Hämolyse doch erscheint. Folglich kann die Hämolyse sowohl während der Entwicklung eines Koagulationsprozesses der Globularkolloide, wie auch während der Reversionsbildung eines schon stattgefundenen Koagulationsprozesses auftreten.

Analoge Resultate kann man bei Behandlung von mit $HgCl_2$ fixierten Blutkörperchen durch andere Reagentien erhalten; so bemerkt man rasche Hämolyse, wenn man einer Suspension solcher Blutkörperchen in destilliertem Wasser oder in physiologischer Kochsalzlösung wenige Tropfen Schwefelwasserstoffwasser hinzufügt. Im allgemeinen gelingt dem H_2S Hämolyse der Blutkörperchen zu bewirken, mögen diese mit was für einem Metallsalz auch immer fixiert worden sein; und dies ist begreiflich, weil ja bekanntlich der H_2S das spezifische Reagens der Schwermetalle ist[1]).

Deswegen erscheint die Folgerung wohl begründet, daß die Koagulation der Blutkörperchen den Kationen der untersuchten Metallsalze zuzuschreiben und daß sie ein labiler, reversibler Prozeß sei, wie es eben analoge, durch metallische Ionen bewirkte Koagulationsprozesse labiler und reversibler Natur bei anderen Geweben[2]) gibt. Und daß die dargestellten Erscheinungen sich in solcher Weise entwickeln müssen, begreift man deutlich, wenn man sich auf die bekannten Untersuchungen des *Galeotti*[3]) über Labilität, Reversibilität und über die verschiedene chemische Zusammensetzung der Metallverbindungen der Eiweißkörper beruft.

---

[1]) Jedoch sind in einigen Fällen diese Erscheinungen viel komplexer: Wenn wir mit H_2S eine Suspension in destilliertem Wasser von mit $AgNO_3$ fixierten Blutkörperchen behandeln, so bemerken wir rasche Hämolyse; wenn dagegen die Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert sind, so gehen diese von einer grauen Färbung in eine schwarze über, ohne aber Hämolyse aufzuweisen, auch wenn sie nach solcher Behandlung in destilliertes Wasser übergeführt werden. Natürlich sind in diesem Versuche die sich entwickelnden Vorgänge sehr kompliziert, eben im Verhältnisse zur komplizierten Beschaffenheit der Gleichgewichte, die sich in dem Blutkörperchen zwischen Molekülen, Ionen, organischen und mineralischen Kolloiden bilden; weswegen es wohl schwer ist, genaue Verhältnisse zwischen den verschiedenen Fällen aufzustellen, weil die, von jedem Blutkörperchen fixierte Metallmenge bekannt sein müßte, um die Reagentien in den entsprechenden Konzentrationen anwenden zu können.

[2]) Läßt man eine Augenhornhaut eine Zeitlang in $^{n}/_{10}HgCl_2$-Lösung stehen, so wird sie hart, weißfärbig, aufgerollt; wird sie in diesem Augenblicke in eine $^{n}/_{10}NaJ$-Lösung gegeben, so nimmt sie sofort eine Gelbfärbung, die an einigen Stellen ins Rote übergeht, an; dann verliert sie nach und nach diese Färbung, dehnt sich wieder aus, erreicht ihre frühere Form und Festigkeit wieder und nimmt ein durchscheinendes, körniges Aussehen an. (*L. Sabbatani*, Arch. di fisiol. **3**, 81. 1905.)

[3]) *G. Galeotti*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **60**, 492. 1904.

6. Zusammenfassung und Schlußfolgerung.

Wenn wir das bis jetzt Behandelte in kurzer Form zusammenfassen, können wir sagen, daß sowohl die Hämolyse wie auch die Koagulation der Blutkörperchen durch die untersuchten Metallsalze von Kationen bewirkt sind; und dies wird von dem Verhältnisse, welches zwischen hämolysierender und koagulierender Tätigkeit einerseits und zwischen ionischer Konzentration andererseits besteht, bewiesen. Denn wir haben festgestellt, daß irgendeine Veränderung dieser letzten eine parallele Veränderung jener Tätigkeiten mit sich bringt und daß unter den verschiedenen Verbindungen eines Metalles die am stärksten ionisierten auch die wirksamsten, sowohl in der Hämolyse wie in der Koagulation sind. Die physikalisch-chemischen Prozesse, deren Endresultat Hämolyse oder Koagulation ist, entwickeln sich mit verschiedener Geschwindigkeit je nach der Temperatur, Konzentration und spezifischen Tätigkeit der Metallionen und je nach den besonderen Eigenschaften des untersuchten Salzes, im Verhältnisse eben zu der in den verschiedenen Fällen verschiedenen Verschiebungsgeschwindigkeit unter den Phasen eines sehr komplexen Gleichgewichtes. Wahrscheinlich muß man der verschiedenen Geschwindigkeit dieser Verschiebungen gewisse besondere histologische Bilder, die in den mit einigen Salzen fixierten Blutkörperchen auffallen, zuschreiben.

Im allgemeinen kann man behaupten, daß die zur Koagulation hinneigenden physikalisch-chemischen Prozesse als allererste erscheinen und daß sie sich bei manchen hohen Konzentrationen so rasch entwickeln, daß das Endresultat eine plötzliche Koagulation der Blutkörperchen ist; bei nicht so hohen Konzentrationen geht die Bildung jener Prozesse weniger rasch vor sich, wobei sie in ihrer Entwicklung von einer Hämolyseerscheinung durchzogen werden und als Endresultat Koagulation von zersplitterten Blutkörperchenüberresten stattfindet. Bei niedrigeren Konzentrationen bilden sie sich langsam aus, während ihre Entwicklung nach dazwischen stattgefundener Hämolyseerscheinung durch eine Zunahme der Viscosität der hämolysierten Flüssigkeit angezeigt wird. Bei noch geringeren Konzentrationen wird auch das Zunehmen der Viscosität nicht mehr wahrgenommen.

Wenn man mit Hilfe entsprechender chemischer Reagentien von den fixierten Blutkörperchen einen Teil des koagulierenden Agens in dem Maße entfernt, daß man eine niedrigere Konzentration als die koagulierende Minimalkonzentration erhält, so erscheint Hämolyse, die sich sowohl während der Entwicklung von Prozessen, die zur Koagulation hinneigen, als auch während der Reversion einer schon stattgefundenen Koagulation entwickeln kann. Man darf deshalb behaupten, daß das Metall in den fixierten Blutkörperchen als Ion noch vorhanden ist und daß wahrscheinlich die Koagulation durch Bildung einer Ver-

bindung oder eines ionisch-proteinischen Adsorptionsproduktes, der eben die bewiesenen Labilitäts- und Reversibilitätseigenschaften und verschiedene Zusammensetzung besitzt, verursacht wird. Es scheint demnach das, was ich früher einmal gesagt habe, bestätigt, daß nämlich ein Erreger, das Metallion, je nach seiner Konzentration, vollkommen verschiedene Erscheinungen, wie z. B. Fixierung und Hämolyse, hervorrufen kann. Bei jener Gelegenheit habe ich das festgestellte Verhältnis zwischen Lösungstension der Metalle und ihrer hämolytischen und fixierenden Wirkung erläutert und mich dabei auf die bekannten Arbeiten *Mathews*[1]) über den Spannungskoeffizienten der Elektrolyten gestützt.

Indem ich mich auf die Forschungen von *M. Fischer*[2]) und *Iscovesco*[3]) über die verschiedene chemische und elektrische Natur der Globularkolloide und auf das, was über die toxische Wirkung der Ionen auf die Cellularkolloide bekannt ist, berief, untersuchte ich, was für Veränderungen in dem komplexen Gleichgewicht der roten Blutkörperchenkolloide durch Eintreten einer positiv-elektrischen Ladung stattfinden könnte.

Auf Grund von vielfachen Erwägungen nahm ich an, daß als Folge der Wirkung einer solchen Ladung sich im allgemeinen physikalisch-chemische Prozesse entwickeln, die zur Koagulation der entgegengesetzt bezeichneten Globularkolloide hinneigen und die mehr oder minder rasch, mehr oder minder stark auftreten, je nach der spezifischen Tätigkeit der Metallionen (deren Index die Lösungstension bildet) und ihrer Konzentration. Wenn sie sich sehr rasch entwickeln, gelangt man zur Koagulation; wenn sie sich dagegen langsam entwickeln, so gelangt man zu Ladungsverschiebungen im komplexen Gleichgewicht der Globularkolloide (vielleicht durch das Überwiegen der Ladung der positiv-elektrischen Kolloide), die einen sich in Hämolyse kundgebenden Auflockerungsprozeß verursachen. Diese hauptsächlich theoretischen Erwägungen werden durch das, was bezüglich der Verhältnisse, die zwischen den zur Koagulation und zwischen den zur Hämolyse hinneigenden Prozessen bestehen, auch experimentell unterstützt; wir haben nämlich gesehen, wie jene diesen letzten vorausgehen und wie für manche Konzentrationen, die vor dem Erscheinen der Hämolyse begonnenen Koagulationsprozesse auch nach der Hämolyse fortdauern. Außerdem haben wir gezeigt, wie durch Abnahme der Konzentration des koagulierenden Erregers in den fixierten Blutkörperchen eine Reversion in der Koagulation bestimmt werden kann und wie an einem bestimmten Zeitpunkte dieses Prozesses die Bildung der Hämolyse

[1]) *A. P. Mathews*, Americ. journ. of physiol. **11**, 455; **1901**; **14**, 203; **1905**.
[2]) *M. H. Fischer*, Das Ödem. S. 170; Die Natur der Hämolyse. Dresden 1910.
[3]) *H. Iscovesco*, Etudes sur les humeurs de l'organisme. Paris **1906**.

erscheint. Es scheint demnach die Behauptung gerechtfertigt, daß die Hämolyse bei einem bestimmten kritischen Werte, den man sowohl während der Bildung von Prozessen, die zur Koagulation hinneigen, wie auch während der Reversion einer schon stattgefundenen Koagulationserscheinung erreichen kann, auftritt.

Ob überhaupt und in welchem Maße diese Erwägungen auf eine allgemeine Erläuterung der vielfachen pharmakologischen Wirkungen der Metalle übergeführt werden können, wird in einer anderen Arbeit untersucht werden; einstweilen genügt die Bemerkung, wie es nach dem bisher Behandelten leichtverständlich ist, daß ein und dasselbe Agens 2 scheinbar verschiedene Erscheinungen, wie die Koagulation der Blutkörperchen und die Hämolyse, hervorrufen kann. Das, was bis jetzt erwähnt wurde, führt zu einem Schlusse, der beim ersten Anblicke ein Paradoxon zu sein scheint: Die zur Koagulation der Blutkörperchen hinneigenden Änderungen in den Globularkolloiden sind eben diejenigen durch welche auch die Hämolyse bedingt wird.

Die Triketohydrindenhydrat(Ninhydrin)-Reaktion als quantitative kolorimetrische Bestimmungsmethode des Aminosäurenstickstoffes; praktische Anwendung der Methode.

Von

H. Riffart.

(Mitteilungen aus dem Städt. Nahrungsmittel-Untersuchungsamt, Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 8. April 1922.)

Triketohydrindenhydrat, das Ninhydrin der Höchster Farbwerke, wurde zuerst von *Ruhemann*[1]) als Reagens auf Aminosäuren verwendet.

Weitere Untersuchungen über die Triketohydrindenhydratreaktion wurde von *E. Abderhalden* und *H. Schmidt*[2]) angestellt, die sie zum Nachweis der durch Fermente abgebauten dialysierbaren Eiweißstoffe verwendeten.

Sie lösten 0,1 g Triketohydrindenhydrat in 30—40 ccm Wasser auf, gaben von dieser Lösung 1—2 Tropfen zu 1 ccm der zu prüfenden genau neutralisierten Flüssigkeit und erhitzten kurze Zeit bis zum Sieden. Beim Abkühlen zeigte sich dann beim positiven Ausfall der Reaktion eine mehr oder weniger ausgeprägte Blaufärbung. Die Verfasser fanden, daß auf das Arbeiten mit neutralen Lösungen größter Wert gelegt werden muß. Bei schwach saurer Reaktion der untersuchten Flüssigkeit erhielten sie noch Blaufärbung, aber mit einem Stich ins Rötliche; war die Reaktion stark sauer, dann trat Rotviolett-Rotfärbung ein oder blieb sogar jede Färbung aus; sehr störend war die alkalische Reaktion; sie verhinderte das Zustandekommen der Blaufärbung. Neutralsalze störten nicht.

In der genannten Arbeit heißt es weiter: „Aus dieser Zusammenstellung geht klar hervor, daß Eiweißstoffe mit dem Reagens eine intensive Blaufärbung geben, auch die Peptone; ebenso alle bis jetzt untersuchten Polypeptide; das gleiche gilt für die untersuchten α-Aminosäuren. Auch das Isoserin hat geringe Blaufärbung und ebenso das β-Alanin. Da jedoch die Reaktion bei verschiedenen Präparaten verschieden stark ausfiel, ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß bei der Empfindlichkeit der Reaktion Verunreinigungen in Betracht kommen. Von den α-Aminosäuren machen eine Ausnahme das Prolin, Oxyprolin und die Pyrrolidoncarbonsäure. Diese 3 Säuren besitzen keine Amino-, sondern eine Iminogruppe. Bei allen 3 Verbindungen gab ihre Lösung nach Zusatz des Reagenses keine Blaufärbung. Nach den bisherigen Erfahrungen tritt eine Blaufärbung nur

---

[1]) Journ. of the chem. Soc. Transact. **97**, 1438, 2025. 1910; **99**, 792, 1111; **101**, 780. 1912.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **72**, 37—42. 1911.

dann auf, wenn neben einer freien Aminogruppe eine freie Carboxylgruppe vorhanden ist. Von beiden Gruppen können die Verbindungen auch mehrere besitzen. Ob im Einzelfalle die Stellung der Aminogruppe zum Carboxyl von Bedeutung ist, bedarf noch weiterer Prüfung. Triketohydrindenhydrat ist ein vorzügliches Reagens auf die Reinheit der Diketopiperazine; Glucosamin gibt keine Blaufärbung, wohl aber die Glucosaminsäure. Färbungen treten auch auf mit alkalischen, speziell ammoniakalischen Lösungen. Wir beobachteten in keinem Falle Blaufärbung; Ammoniak kann die Farbreaktion stören; ist solches vorhanden, dann wird es am besten durch Verdampfen der Lösung vertrieben. Erwähnt sei noch, daß die Haut sich mit dem Reagens intensiv blau färbt."

Die Empfindlichkeit der Reaktion wird wie folgt angegeben:

Glykokoll	1 : 10 000
Alanin	1 : 10 000
l-Tyrosin	1 : 5 000

In einer späteren Arbeit *Abderhaldens*[1]) erfährt die Ninhydrinreaktion eine kleine Abänderung. Sie wird dort wie folgt angegeben: Zu 10 ccm einer genau neutralisierten auf Aminosäuren zu prüfenden Lösung gibt man 0,2 ccm einer 1 proz. wässerigen Ninhydrinlösung, gibt einige Siedesteinchen hinzu und kocht genau 1 Minute auf. Bei Anwesenheit von Aminosäuren wird die Lösung sofort, mindestens aber nach $^1/_2$stündigem Stehen, tiefviolett; bei Anwesenheit von nur Spuren Aminosäuren bläulich gefärbt.

Nach *W. Halle*, *E. Löwenstein* und *E. Přibram*[2]) geben auch reduzierende Zucker und alipathische Alkohole mit Triketohydrindenhydrat Blaufärbung, allein nur dann, wenn bei neutraler Reaktion die betreffenden Verbindungen in sehr hohen Konzentrationen, das heißt in Substanz vorliegen (bei Zusatz von Wasser verschwindet der Farbton in allen Fällen) oder wenn nach dem Kochen 5 proz. Natronlauge zugefügt wird. Eine Verwechslung mit der Aminosäurereaktion, die ja in wässriger. Lösung ausgeführt wird, kommt also hier *nicht in Frage.*

Von Bedeutung sind dagegen die Veröffentlichungen von *C. Neuberg* (diese Zeitschr. *56*, 500 und *67*, 56). Verfasser findet, daß ein typischer Ausfall der Ninhydrinreaktion auch mit Körpern erhalten wird, die mit Aminosäuren nicht das geringste zu tun haben. So geben eine positive Ninhydrinreaktion: Amine, namentlich in Verbindung mit schwachen Säuren wie Essigsäure, Phosphorsäure, Borsäure und Kohlensäure, ebenso Oxyamine. Ferner Aminoaldehyde, Harnstoffderivate, organische Aminosulfosäuren, Ammoniaksalze, von Aldehyd- und Ketonsäuren und bestimmte organische Säuren, die Carbonylverbindungen und Halogenaldehyde, die vorher mit Ammoniak in Berührung gewesen waren. Auch verschiedene anorganische Substanzen können nach Angabe des Verfassers die Reaktion auslösen. *Neuberg* kommt daher zu dem Schluß, daß die Ansicht *Abderhaldens*, daß für einen positiven

[1]) Beiträge zur Klinik der Infektionskrankheiten und zur Immunitätsforschung, 1913, S. 243.

[2]) Diese Zeitschr. **55**, 357. 1913.

Ausfall der Ninhydrinreaktion eine freie Aminogruppe und eine freie Carboxylgruppe vorhanden sein muß, nicht mehr aufrecht erhalten werden kann und daß man keineswegs die Diagnose von Aminosäuren einfach auf einen positiven Ausfall der Triketohydrindenhydratreaktion begründen kann. Ferner hat *Neuberg* gefunden, daß bei Anstellung der Reaktion möglichste Neutralität anzustreben ist und daß z. B. die freien Amine oder ihre Chlorhydrate in einigen Fällen keine Reaktion geben. wohl aber die Salze dieser Amine mit schwachen Säuren, wie mit Essigsäure, Phosphorsäure oder Borsäure. Es muß also großer Wert auf die Reaktion und unter Umständen auf eine Pufferung mit Natriumacetat. Phosphat, Borat oder Calciumcarbonat gelegt werden."

E. Herzfeld[1]) benutzt den beobachteten Einfluß der Konzentration der zu untersuchenden Lösungen an Aminosäuren auf die Triketohydrindenhydratreaktion zur Ausarbeitung einer quantitativen spektrophotometrischen Methode.

Er verfährt folgendermaßen: „Man bringt 0,5 ccm einer 1 proz. wässerigen Ninhydrinlösung in eine Porzellanschale, fügt die zu prüfende ammoniakfreie. neutral reagierende Lösung hinzu und dampft auf dem Wasserbade zur Trockne ein. Der Trockenrückstand wird mit kaltem, wenn schwerlöslich, mit heißem. absolutem Alkohol digeriert, wobei sich ein großer Teil auflöst. Die noch am Boden der Schale anhaftenden Teile können mit Hilfe eines Glasstabes in absolutem Alkohol vollkommen verrieben werden, wobei wieder ein großer Teil in Lösung geht. Man wiederholt dieses Verfahren solange, bis der zugesetzte Alkohol farblos bleibt. Sollten die im Meßzylinder angesammelten alkoholischen Extrakte keine violette bis blaue Farbe, sondern eine rote haben, so rührt man mit Hilfe eines mit Ammoniak angefeuchteten Glasstabes um, worauf dann die violette bis blaue Farbe auftritt. Man füllt nun diese Lösung mit absolutem Alkohol bis zu einem bestimmten Volumen auf, filtriert und füllt damit die eine Röhre des Spektrophotometers. Zur Füllung der anderen Röhre dampft man 0,5 ccm 1 proz. Ninhydrin ganz trocken ein und löst den Rückstand in 20 ccm absolutem Alkohol. War die zu untersuchende gefärbte Lösung bis 40, 50, 60 usw. ccm aufgefüllt, so vermerkt man eine 2-, 2,5-, 3fache Verdünnung und multipliziert mit der entsprechenden Zahl den Extinktionskoeffizienten. Auf Grund der Untersuchung einer Anzahl Aminosäuren berechnet *Herzfeld* den Prozentgehalt von $-NH_2 \cdot COOH$ wie folgt:

$$-NH_2 \cdot COOH = \frac{\text{Extinktionskoeffizient}}{0{,}046 \text{ (Konstante)}}.$$

Grazia Norzi[2]) verwendet die Ninhydrinreaktion zum Nachweis verdorbenen Mehles. Verfasser gibt folgende Methode an:

0,5 g Mehl werden 10—12 Stunden in sterilem Wasser dialysiert. 5 ccm Dialysat werden in einem Reagensglas mit 5 Tropfen einer 1 proz. Ninhydrinlösung gemischt und 2—3 Minuten gekocht. Zersetztes Mehl gibt hierbei eine Violettfärbung und zwar um so intensiver, je weiter die Zersetzung vorgeschritten ist. Als Vergleiche dienen Dialysate von frischem, gesundem Mehle. Wie in der Arbeit angegeben ist, beruht die Violettfärbung auf der Anwesenheit von Aminosäuren. die sich aus den zersetzten Eiweißkörpern abgespalten haben.

[1]) Diese Zeitschr. **59**, 249. 1914.

[2]) Giorn. Farm. Chim. **64**, 533—538. 1915.

Die vorliegenden Arbeiten, besonders die Feststellungen von *C. Neuberg* sowie *Halle, Löwenstein* und *Pribram* veranlaßten mich, die Triketohydrindenhydratreaktion zu einem quantitativen kolorimetrischen Bestimmungsverfahren des Aminosäurestickstoffes auszuarbeiten. Mit dieser Methode wurde dann in Ergänzung der von den erwähnten Autoren gemachten Angaben das Verhalten des Triketohydrindenhydrates gegenüber einer Reihe anderer Verbindungen, besonders gegenüber Aminen und Amoniumsalzen geprüft.

Die von *Herzfeld* ausgearbeitete spektrophotometrische Methode erreicht infolge des Eindampfens der zu untersuchenden Lösung mit Ninhydrin eine sehr hohe Empfindlichkeit; Verfasser konnte noch 0,0005 mg Glykokoll bzw. Alanin nachweisen. Andererseits ist aber mit dem Eindampfen zweifellos eine Reihe von Fehlern verbunden, die keineswegs unberücksichtigt bleiben können. Einmal werden beim Eindampfen mit Ninhydrin neben Aminosäuren auch alle die Stoffe Farbstoff bilden, die auf Grund der Untersuchungen von *Halle, Löwenstein* und *Pribram* nur in sehr hohen Konzentrationen mit Ninhydrin reagieren. Es sind dies alle reduzierenden Zuckerarten sowie aliphatische Alkohole (Glycerin, Äthylenglykol, Erythrit, Glycerinaldehyd, Aceton usw. sowie alle Zucker mit freier Aldehyd- oder Ketogruppe). Sind solche Stoffe vorhanden, so werden sie bei dem von *Herzfeld* vorgeschlagenen Verfahren die Aminosäurebestimmung unter Umständen sehr stark beeinflussen können, während bei Arbeiten in wässeriger Lösung eine Störung von dieser Seite nicht zu befürchten ist. Dasselbe läßt sich sagen bezüglich des Vorhandenseins kleiner Mengen von Ammoniumverbindungen sowie von Aminen bestimmter Zusammensetzung. Denn auch die Ammoniumverbindungen sowie gewisse Amine geben mit Triketohydrindenhydrat die charakteristische Blauviolettfärbung; jedoch ist nach meinen Untersuchungen diesen Verbindungen gegenüber die Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion geringer als gegenüber den Aminosäuren, so daß bei der Anwesenheit kleiner Mengen der genannten Verbindungen (etwa unter 15 mg Stickstoff im Liter) eine Beeinflussung der Bestimmung des Aminosäurestickstoffes nicht zu erwarten ist. Bei *Herzfeld* würden jedoch durch das Eindampfen auch sehr kleine Mengen dieser Verbindungen mit in Reaktion treten. Endlich sei noch folgender Umstand erwähnt.

Herzfeld schreibt: „Sollten die im Meßzylinder angesammelten alkoholischen Extrakte keine violette bis blaue Farbe, sondern eine rote haben, so rührt man mit Hilfe eines mit Ammoniak befeuchteten Glasstabes um, worauf dann die violette bis blaue Farbe auftritt."

Demgegenüber stellte ich fest, daß Ammoniak nicht nur beim Eindampfen mit Ninhydrin Rotfärbung gibt, sondern daß auch der Zusatz eines Tropfens Ammoniaks zu einer Lösung von Ninhydrin in absolutem

Alkohol derselben eine kräftig ziegelrote Farbe erteilt, die den durch Messung im Spektrophotometer erhaltenen Aminosäurenwert sicher beeinflussen dürfte.

In folgendem sei der Kürze halber statt „Triketohydrindenhydrat“ stets die geschützte Handelsbezeichnung „Ninhydrin“ angewendet, das mir von den Höchster Farbwerken in den für vorliegende Arbeit notwendigen Mengen in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt wurde.

I. Die Ninhydrinreaktion; ihre Verwendung zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung des Aminosäurestickstoffes.

Einleitende Versuche, die an wässrigen 0,1 proz. Asparaginsäurelösungen vorgenommen wurden, ergaben, daß die Ninhydrinreaktion hauptsächlich von folgenden Faktoren beeinflußt wird:

von der Dauer der Erhitzung;

von der Wasserstoffionenkonzentration und von dem Gehalt der zu untersuchenden Lösung an α-Aminosäuren.

Das von *Abderhalden* vorgeschlagene Verfahren — Kochen der zu untersuchenden Lösung über freier Flamme eine Minute lang — mußte für den vorliegenden Zweck als unzweckmäßig angesehen werden. Nach dem *Abderhalden*schen Verfahren erhielt ich trotz möglichster Einhaltung gleicher Bedingungen sehr unregelmäßige Farbtöne. Bei den verhältnismäßig kleinen Flüssigkeitsmengen ließ sich nur in seltenen Fällen ein gleichmäßiges Erhitzen erzielen. Ich wählte daher das Erhitzen des Reaktionsgemisches im siedenden Wasserbade, wobei auch bei größeren Versuchsanordnungen gleiche Verhältnisse gewährleistet wurden; auch wurde festgestellt, daß beim Erhitzen im Wasserbad viel kräftigere Farbtöne erzielt wurden, als beim Kochen mit den gleichen Aminosäuremengen.

Daß die Ninhydrinreaktion in hohem Maße abhängig ist von der Wasserstoffionenkonzentration, stellte ich durch folgende Versuche fest: Nach den von *Sörensen*[1]) in seiner Arbeit „Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen“ gemachten Angaben wurden Phosphatmischungen hergestellt, die den Wasserstoffionenexponenten 5,600; 5,910; 6,239; 6,468; 6,643; 6,813; 6,976; 7,146; 7,347 und 7,648 entsprachen. Als Ausgangsmaterial dienten primäres Kaliumphosphat und sekundäres Natriumphosphat, wie sie von der Firma *Kahlbaum* unter der Bezeichnung „zu Enzymstudien nach Sörensen“ geliefert werden. Von diesen einzelnen Phosphatmischungen wurden je 2 ccm zu je 2 ccm einer 0,1 proz. Asparaginsäurelösung gegeben. Nach Zusatz von 1 ccm einer 1 proz. Ninhydrinlösung wurde 20 Minuten im Wasserbade erhitzt. Es zeigte sich, daß

[1]) Diese Zeitschr. **21**, 175. 1909.

bei dem Versuch, dem die Stufe 6,976 zugesetzt war, der Farbstoff am reinsten und stärksten die charakteristische Blauviolettfärbung aufwies. Bei den höheren Stufen gingen die Farbtöne immer stärker ins Violette über; bei der Stufe 7,648 war die Farbe schon schmutzigviolett. Bei den Stufen unter 6,976 nahm die Farbstoffbildung an Intensität rasch ab; die Töne waren zwar etwas reiner blau, als bei den höheren Stufen, aber schwächer; bei der Stufe 5,910 war nur noch eine geringe Färbung zu beobachten; bei Stufe 5,600 trat überhaupt keine Färbung mehr ein. Die Abstufung der Farbtöne von Stufe zu Stufe war dabei derartig stark, daß man die Ninhydrinreaktion gut zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration für das Exponentenintervall von 5,9 bis etwa 7,4 verwenden könnte.

Aus obigen Versuchen geht jedenfalls hervor, welch große Rolle die Wasserstoffionenkonzentration bei der Ninhydrinreaktion spielt. Diese zu einer quantitativen auszubauen, war nur dann möglich, wenn die zu untersuchenden Lösungen genau neutralisiert wurden und auch während dem Erhitzen im Wasserbad eine Änderung ihrer Wasserstoffionenkonzentration verhindert wurde. Ich verfuhr daher folgendermaßen:

Da beim Vorversuche die Stufe 6,976 als günstigste ermittelt wurde, stellte ich zunächst die zu untersuchende Lösung auf diese Stufe mit sehr verdünnter Lauge bzw. Säure (n/400) und Neutralrot als Indikator ein; als Vergleich diente eine ebenfalls mit Neutralrot versetzte Phosphatmischung, die dieser Stufe entsprach. Bei geeignetem Zusatz des Indikators läßt sich die Neutralisation auf einen Tropfen n/400-Lauge bzw. Säure genau ausführen. Um ferner die Konzentration der Wasserstoffionen beim Erhitzen konstant zu halten, setzte ich in Anlehnung an die oben erwähnte *Sörensen*sche Arbeit einen Puffer in Form der der Stufe 6.976 entsprechenden Phosphatmischung zu. Auf diese Weise werden Einflüsse alkalischer Bestandteile des Glases, der Kohlensäure der Luft oder etwaiger beim Erhitzen in geringen Mengen auftretender Zersetzungen beseitigt. Die Bedeutung des Puffers ist die, daß er die Wasserstoffionenkonzentration konstant hält und die Zufuhr kleiner Mengen Säure oder Basen nur unwesentliche Änderungen der Ionenkonzentration wird hervorrufen können. Wie wichtig auch bei der vorliegenden Methode der Zusatz eines Puffers ist, ergibt sich daraus, daß bei kleineren Aminosäurengehalten ohne Zusatz eines Puffers keine Färbungen auftraten, während mit Puffer bei denselben Aminosäurenmengen noch schöne Färbungen erhalten wurden.

Die ausführliche Beschreibung der Arbeitsweise werde ich weiter unten bringen.

Mittels der so geschaffenen Unterlagen war es nun möglich, den Einfluß verschiedener Aminosäurenkonzentrationen auf die Ninhydrinreaktion zu studieren. Je 2 ccm wässeriger Asparaginsäurelösungen

von den Konzentrationen 0,1; 0,06; 0,05; 0,04 usw. bis 0,001% wurden im Reagensglas mit Neutralrot als Indikator (0,05 ccm) neutralisiert, mit je 2 ccm des Phosphatgemisches als Puffer und je 1 ccm der 1 proz. Ninhydrinlösung versetzt und 30 Minuten im lebhaft siedenden Wasserbade erhitzt; bei den Asparaginsäurekonzentrationen von 0,1% bis 0,04% traten schon nach 2 Min. Färbungen auf; bei 0,03% und 0,02% nach 4 Min.; bei 0,01% und 0,009% nach 5 Min., bei 0,008% und 0,007% nach 6 Min.; bei 0,006% nach 7 Min.; bei 0,005% nach 10 Min.; bei 0,004% nach 12 Min.; bei 0,003% nach 24 Min. 0,001% Asparaginsäure gab auch nach $^3/_4$- und 1 stündigem und 0,002% nach 30 minutigem Erhitzen keine Färbung; es bildete sich nur schwache Gelbfärbung, wie sie auch bei langem Erhitzen von Ninhydrin allein ohne Asparaginsäure unter Einhaltung der gleichen Bedingungen beobachtet wurde. 0,002% Asparaginsäurelösung gab zwar noch geringe Färbung, die jedoch nicht in allen Fällen als eindeutig angesehen werden kann. Bei sämtlichen übrigen Versuchsanordnungen lagen die Farbstärken in der Reihenfolge der Asparaginsäurekonzentrationen gut abgestuft, so daß man auch bei den niedrigsten Konzentrationen (bis zu 0,003% Asparaginsäure) jedes 0,001% deutlich unterscheiden konnte. Nur bei den höheren Konzentrationen von etwa 0,04% an aufwärts war eine Unterscheidung infolge der Dichte des Farbstoffes schwer; diese Schwierigkeit wurde beseitigt, indem bei allen späteren Versuchen die gebildeten Farbstofflösungen auf 100 ccm mit destilliertem Wasser verdünnt und in Zylindern aus farblosem Glas verglichen wurden. Auf diese Weise ließ sich der kolorimetrische Vergleich in allen Fällen gut durchführen. Bemerkt sei noch, *daß die Farbtöne bei sämtlichen Versuchsanordnungen gleich, nämlich blauviolett waren, ein Beweis, daß in allen Fällen dieselbe Wasserstoffionenkonzentration vorhanden war.*

Aus obigen Versuchen geht hervor, daß sich noch 0,003% Asparaginsäure einwandfrei nachweisen lassen; diese Menge entspricht 0,00028% Aminosäurestickstoff = rund 3 mg Aminosäurestickstoff im Liter. Die Empfindlichkeit der Reaktion beträgt demnach, berechnet auf Aminosäurestickstoff, etwa 1: 340 000.

Durch Anwendung größerer Mengen der Asparaginsäurelösung als 2 ccm ließ sich die Reaktion nicht empfindlicher gestalten. Ferner zeigten auch hier Parallelversuche, daß die Zugabe einer Pufferlösung notwendig ist; wurde die Phosphatmischung fortgelassen, so traten nur bei den höheren Konzentrationen Färbungen auf, während sie bei den niedrigeren Konzentrationen vollständig ausblieben, obwohl in allen Fällen mit n/400 Lauge neutralisiert worden war (Hydrolyse der aminosauren Salze).

Ferner ist zu beachten, daß man zweckmäßig den Vergleich der entstandenen Färbungen bzw. ihrer Verdünnungen erst $^1/_2$ Stunde nach

dem Erhitzen vornimmt, da nach den gemachten Erfahrungen die Farbstärke kurz nach dem Erhitzen noch etwas zunimmt. Der gebildete Farbstoff ist sehr beständig; bei längerem Stehen verblaßt er allmählich; jedoch waren die Färbungen noch nach 60 Stunden auch in den Verdünnungen deutlich vorhanden. Bei direktem Sonnenlicht nehmen die Färbungen rasch ab.

Bezüglich des Zusatzes der erforderlichen Menge Ninhydrin ist folgendes zu bemerken. Die von *Abderhalden* angegebene Menge (0,2 ccm der 1 proz. Ninhydrinlösung auf 10 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit) ist auch bei verhältnismäßig kleinen Asparaginsäurekonzentrationen nicht ausreichend; es treten wohl Färbungen auf, die jedoch bei Zusatz größerer Mengen an Ninhydrin noch viel stärker wurden. Es ist leicht erklärlich, daß die restlose Auswertung der Reaktion einen Überschuß an Ninhydrin erfordert. In dieser Richtung angestellte Versuche ergaben, daß für die hier in Betracht kommenden Aminosäurenkonzentration ein Zusatz von 1 ccm der 1 proz. Ninhydrinlösung in allen Fällen genügen dürfte.

Nachdem so die Ninhydrinreaktion in ihren Einzelheiten studiert und festgelegt war, verglich ich die mit vier verschiedenen Asparaginsäurekonzentrationen (0,004; 0,009; 0,02 und 0,07% Asparaginsäure) nach der vorstehenden Arbeitsweise erhaltenen Färbungen mit den Färbungen von Asparaginsäure-Vergleichslösungen bekannter Konzentration. In allen Fällen wurde der theoretische Wert gefunden.

Während sich somit in allen den Fällen, in denen eine bekannte Aminosäure vorliegt, ohne weiteres eine Gehaltsbestimmung des Aminosäurestickstoffes ausführen läßt, war es weiterhin Aufgabe, festzustellen, ob — wie übrigens zu erwarten — die Stärke des bei der Reaktion gebildeten Farbstoffes allein abhängig von der Menge des anwesenden Aminosäurestickstoffes ist. Ist dies der Fall, dann muß sich mit einer beliebigen bekannten Aminosäure als Vergleichslösung — z. B. Asparaginsäure — der Gehalt an Aminosäurestickstoff in jeder anderen beliebigen Aminosäure und auch in Gemischen verschiedener Aminosäuren bestimmen lassen. Ich führte folgende Versuche aus:

Unter Berücksichtigung des Aminosäurestickstoffgehaltes stellte ich aus folgenden α-Aminosäuren Lösungen her, die 10 mg Aminosäurestickstoff im Liter gelöst enthielten: Asparaginsäure, Alanin, Phenylalanin, Glutaminsäure, Glykokoll, Leucin, Tyrosin und Tryptophan. Als Vergleichslösung wählte ich wieder Asparaginsäure und zwar der einfacheren Berechnung wegen: 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 mg Aminosäurestickstoff im Liter entsprechend. Nach den gemachten Erfahrungen genügen Vergleichslösungen, die um 2 mg/l verschieden sind, da sich die Zwischenwerte infolge der großen Unterschiede der erhaltenen Farbstärken genau genug durch Abschätzen feststellen lassen. Bei

längerer Übung ist es sogar möglich, noch 0,5 mg/l abzuschätzen. Ferner ging ich nicht höher als bis zur Konzentration von 20 mg Aminosäurestickstoff im Liter, um die Zahlen der einzelnen Vergleichslösungen möglichst zu beschränken; außerdem war selbst beim Verdünnen der Farblösungen auf 100 ccm bei diesen höheren Konzentrationen infolge der großen Dichte der Farbstofflösungen ein Vergleich nicht mehr so scharf möglich, als bei den Konzentrationen bis zu 20 mg/l.

Je 2 ccm sowohl der Vergleichslösungen als auch der hergestellten α-Aminosäurenverdünnung wurden dann, wie vorgeschrieben, im Reagensglas genau mit n/400 Lauge neutralisiert, mit 2 ccm des Phosphatgemisches und 1 ccm der 1 proz. Ninhydrinlösung versetzt und $^1/_2$ Stunde im siedenden Wasserbade erhitzt. Die erhaltenen Farblösungen wurden $^1/_2$ Stunde nach dem Erhitzen auf 100 ccm verdünnt und der Vergleich ausgeführt. Über das Resultat dieser Bestimmungen gibt die Tabelle auf Seite 87 Aufschluß.

Aus der Tabelle ergibt sich folgendes:

Die gefundenen Werte zeigen, daß bei den untersuchten α-Aminosäuren die Gehalte an Aminosäurestickstoff nach der vorliegenden colorimetrischen Methode einwandfrei bestimmt werden können. Es bestätigt sich die Annahme, daß unter sonst gleichen Bedingungen die Ninhydrinreaktion in ihrer Stärke allein abhängig ist von der Konzentration des Aminosäurestickstoffes. Die einbasischen Aminosäuren geben die gleiche Farbstärke wie die zweibasischen Aminosäuren (Asparaginsäure und Glutaminsäuren), wenn nur die gleichen Gehalte an Aminosäurestickstoff zugrunde gelegt werden. Ferner zeigt sich, daß der nicht in Aminosäurebindung vorhandene Stickstoff nicht reagiert; denn beim Tryptophan wird, wie aus der Tabelle ersichtlich, der theoretisch erwartete Wert an Aminosäurestickstoff erhalten; der Stickstoff der Indolgruppe tritt somit nicht in Reaktion. Der Analysenfehler ist am größten bei Analin, Phenylalanin und Leucin; er beträgt dort 7,5% des Gesamtgehalte an Aminosäurestickstoff. Bei Glutaminsäure und Glykokoll beträgt er 5%, bei Tyrosin 2,5% und bei Tryptophan wird, wie schon erwähnt, der theoretische Wert erhalten; ebenso bei Asparaginsäure, die ja zugleich als Vergleichslösung diente. Die Farbtöne waren in allen Fällen gleich, nämlich blauviolett; jedoch wurde beobachtet, daß Alanin, Glykokoll und Leucin Farbtöne geben, die eine kleine Nuance blauer sind als die der anderen Aminosäuren, ein Umstand, der nach den gemachten Erfahrungen auf noch vorhandene Unterschiede in den Wasserstoffionenkonzentrationen zurückzuführen sein dürfte, die aber bei der vorgeschlagenen Arbeitsmethode nur sehr gering sein können.

Da die bei den einzelnen Aminosäurestickstoffkonzentrationen auftretenden Farbstärken an und für sich sehr stark abgestuft sind, so sind

Tabelle I.

Vergleichslösung: Asparaginsäure.

Art der Aminosäure	Struktur	Aminosäurestickstoff %	Angewandte Menge: 2 ccm einer Lösung mit 10 mg Aminosäurestickstoff im Liter, entsprechend mg		Gefunden in 2 ccm der angewandten Lösung in mg		Gefunden mg Aminosäurestickstoff in Liter	Fehler berechnet auf % des Aminosäurestickstoffgehaltes
			Aminosäurestickstoff	Aminosäure	Aminosäurestickstoff	Aminosäure		
Asparaginsäure	$C_2H_3(NH_2) \cdot (COOH)_2$ Aminobernsteinsäure	10,53	0,02	0,19	0,02	0,19	10,0	0
Alanin	$C_2H_4(NH_2) \cdot COOH$ α-Aminopropionsäure	15,73	0,02	0,12	0,0185	0,111	9,25	−7,5
Phenylalanin	$C_6C_5 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ Phenyl-α-Aminopropionsäure	8,49	0,02	0,24	0,0185	0,222	9,25	−7,5
Glutaminsäure	$C_3H_5(NH_2) \cdot (COOH)_2$ α-Aminoglutarsäure	9,52	0,02	0,21	0,021	0,221	10,5	+5
Glykokoll	$CH_2(NH_2) \cdot COOH$ Aminoessigsäure	18,67	0,02	0,107	0,019	0,101	9,5	−5
Leucin	$C_5H_{10}(NH_2) \cdot COOH$ α-Aminocapronsäure	10,69	0,02	0,187	0,0185	0,173	9,25	−7,5
Tyrosin	$C_6H_4(OH) \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ p-oxyphenyl-α-Amidopropionsäure	7,74	0,02	0,258	0,0195	0,251	9,75	−2,5
Tryptophan	$NH \langle C_6H_4, CH \rangle C \cdot C_2H_3(NH_3) \cdot COOH$ α-Amino-β-Indolpropionsäure	6,73	0,02	0,299	0,020	0,299	10,0	0
Mischung von Asparaginsäure, Alanin, Phenylalanin, Glutaminsäure, Glykokoll, Tyrosin und Tryptophan.	—	—	Angewandte Menge 2 ccm einer Lösung, die je 10 mg der angeführten Aminosäuren im Liter enthält. entsprechend 8,81 mg Aminosäurestickstoff im Liter = 0,0176 mg in 2 ccm.		0,0168	—	8,5	−4,4

derartige kleine Unterschiede in den Farbtönen im allgemeinen für die Bestimmung selbst belanglos; man kann sie außerdem ausschalten, indem man, wie ich es auch später bei der praktischen Anwendung der Methode stets gemacht habe, die Vergleichslösung dem bei der Bestimmung des Aminosäurestickstoffgehaltes auftretenden Farbton möglichst anpaßt, indem man z. B. bei blauvioletten Tönen Asparaginsäure, bei Tönen, die etwas mehr ins bläuliche übergehen, Alanin, Glykokoll oder Leucin als Vergleichslösung wählt. Bezüglich des gefundenen Analysenfehlers ist ferner noch zu berücksichtigen, daß die zur Bestimmung verwendete Menge an Aminosäurestickstoff nur 0,02 mg beträgt und daß das Arbeiten mit derartigen starken Verdünnungen schon an und für sich eine Reihe von Fehlerquellen in sich birgt.

Außer in den einzelnen Aminosäuren bestimmte ich den Gehalt an Aminosäurestickstoff auch in einer Lösung, die alle untersuchten Aminosäuren in gleichen Teilen gemischt enthielt (s. unter Nr. 9 der Tabelle). Der Aminosäurestickstoffgehalt wurde mit einem Fehler von 4,4% des berechneten Aminosäurestickstoffgehaltes ermittelt.

Während die vorstehend untersuchten Verbindungen als freie Aminosäuren vorlagen, führte ich die Ninhydrinreaktion auch mit dem salzsauren Salz des Histidins aus. Dabei fand ich, daß diese Verbindung unter gleichen Verhältnissen wie bei den freien Aminosäuren keinen blauvioletten, sondern einen rötlichen Farbton bildet, dessen Intensität abhängig ist von dem Gehalt an Histidinchlorhydrat. Ich prüfte die Ninhydrinreaktion mit einer schwächeren Histidinchlorhydratkonzentration, indem ich eine Histidinchlorhydratlösung herstellte, die 10 mg Aminosäurestickstoff im Liter enthält; es entstand ein rötlicher Farbton, der die charakteristische Blauviolettfärbung der anderen α-Aminosäuren nur in sehr geringem Maße besaß. Ein Vergleich der Histidinchlorhydratfärbung mit den Asparaginsäurevergleichsfärbungen ließ sich infolge des vorhandenen Farbunterschiedes kaum durchführen; es war zu vermuten, daß das abweichende Verhalten des Histidinchlorhydrates ebenfalls seinen Grund in den Verhältnissen der Wasserstoffionenkonzentration hat. Diese Annahme fand ich durch folgenden Versuch bestätigt: Zu je 2 ccm einer neutralisierten Histidinchlorhydratlösung, die 10 mg Aminosäurestickstoff im Liter besaß, wurden je 2 ccm von Phosphatmischungen zugegeben, die den Wasserstoffionenexponenten 4,976; 5,600; 6,239; 6,643; 6,976; 7,347 und 7,648 entsprachen; nach Zusatz von 1 ccm 1 proz. Ninhydrinlösung wurde dann 20 Minuten im Wasserbad erhitzt. Dabei ergab sich folgendes:

Stufe:	Färbungen:
4,976	Keine Färbung.
5,600	Spur Violettfärbung; unter 4 mg Aminosäurestickstoff im Liter.

Stufe:	Färbungen:
6,239	Charakterist. Blauviolettfärbung; entsprechend 9,0 mg Aminosäurestickstoff im Liter.
6,643	Blauviolettfärbung mit einem Stich ins Rötliche.
6,976	Rot; nicht vergleichbar.
7,347	
7,648	

Es zeigt sich somit, daß auch das Histidinchlorhydrat die charakteristische Blauviolettfärbung der übrigen Aminosäuren gibt, daß aber trotz vorheriger genauer Neutralisation und Zugabe der Pufferlösung beim Erhitzen eine nicht unbeträchtliche Änderung der Wasserstoffionenkonzentration eintritt, so daß bei dem angestellten Versuche das Optimum der Farbstoffbildung nicht mehr, wie bei den übrigen Aminosäuren, mit der Stufe 6,976, sondern mit der Stufe 6,239 als Pufferlösung erreicht wird. Bei dieser Stufe war, wie schon erwähnt, der Farbstoff schön blauviolett, die Farbstärke entsprach 9,0 mg Aminosäurestickstoff im Liter, so daß sich der Fehler auf etwa 10% berechnet. Leider konnte ich mit freiem Histidin selbst die Ninhydrinreaktion nicht anstellen. Jedoch ist wohl anzunehmen, daß sich das freie Histidin normal, das heißt, wie die übrigen untersuchten freien Aminosäuren, verhalten wird. Aber selbst, wenn auch das freie Histidin aus dem Rahmen der übrigen Aminosäuren fallen sollte, so dürfte dadurch die Genauigkeit der Methode an und für sich nur unbeträchtlich beeinflußt werden, da das Histidin unter den Spaltungsprodukten der Proteine nur in geringem Maße, durchschnittlich mit etwa 2%, vertreten ist.

Der große Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den mit Ninhydrin erhaltenen Farbton ist durch die vorstehenden Untersuchungen hinreichend bewiesen. Durch Zusatz eines Phosphatgemisches (mit dem Exponenten 6,976) als Puffer zu den genau neutralisierten Aminosäurelösungen erhielt ich, abgesehen von minimalen Abweichungen, bei allen untersuchten Aminosäuren (das Verhalten des Histidins bedarf noch der Aufklärung) unter sonst gleichen Bedingungen stets nur ein und denselben blauvioletten Farbton. Da ferner die Farbstärke — stets gleiche Versuchsbedingungen vorausgesetzt — abhängig ist von der Konzentration der zu untersuchenden Lösung an Aminosäurestickstoff, so war es, wie ich gezeigt habe, möglich, die Ninhydrinreaktion zu einem brauchbaren Verfahren zur quantitativen colorimetrischen Bestimmung des Aminosäurestickstoffes auszuarbeiten.

Im Anschluß hieran sei kurz ein Vergleich zwischen der vorstehenden colorimetrischen Ninhydrinmethode und der Formoltitration nach *Sörensen* gegeben. Abgesehen davon, daß diese Methode bei Histidin Fehler bis zu 30% aufweist, hat sie den Nachteil, daß mit Tyrosin

wegen der Schwerlöslichkeit seines Bariumsalzes nur höchst ungenaue Resultate erhalten werden; ferner beträgt der Analysenfehler bei Tryptophan etwa 14%. Abgesehen von Histidin, dessen Verhalten, wie schon erwähnt, noch der Aufklärung bedarf, weist demgegenüber die vorstehend ausgearbeitete Ninhydrinreaktion keinen dieser Mängel auf. Der größte Fehler, der mit dem Verfahren erhalten wird, beträgt 7,5%. Tyrosin und Tryptophan werden exakt bestimmt. Nimmt man ferner an, daß die Formoltitration überhaupt mit keinem namhaften Fehler behaftet ist, was ja keineswegs der Fall ist, und auf den Tropfen genau sei, so sehen wir, daß, da 1 ccm n/5 Lauge 2,8 mg Formolstickstoff entspricht, ein Tropfen = 0,05 ccm n/5 Lauge das Resultat um 0,14 mg nach oben oder unten ändert; bei der üblich angewendeten Menge von 20 ccm berechnet sich allein daraus ein Fehler von 7 mg im Liter der Flüssigkeit, während die Ninhydrinreaktion schon 3 mg im Liter anzeigt und von da an aufsteigend jedes mg im Liter mehr durch deutlich sichtbare Farbzunahme an Hand der Vergleichslösung nachzuweisen gestattet. Die Ninhydrinmethode wird daher besonders auch in allen den Fällen mit Erfolg angewendet werden können, wo es darauf ankommt, sehr kleine Mengen von α-Aminosäuren noch exakt nachzuweisen.

Ausführung der Methode.

Es sind folgende Lösungen erforderlich:

1. Asparaginsäure- und (je nach Wahl) Alanin-, Glykokoll- oder Leucinvergleichslösungen in den Konzentrationen: 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 mg Aminosäurestickstoff im Liter.

2. $^{m}/_{15}$-Lösung von „Kaliumphosphat zu Enzymstudien nach *Sörensen*“, welche 9,078 g Kaliumphosphat im Liter enthält.

3. $^{m}/_{15}$-Lösung von „Natriumphosphat zu Enzymstudien nach *Sörensen*“, welche 11,876 g Natriumphosphat im Liter enthält.

4. Neutralrotlösung nach der Angabe von *Sörensen*: 0,1 g Neutralrot in 1000 ccm 50 proz. Alkohols.

5. $^{n}/_{10}$-, $^{n}/_{100}$- und $^{n}/_{100}$-NaOH und H_2SO_4.

6. 1 proz. wässerige Ninhydrinlösung.

Das zur Herstellung der Lösung benutzte Wasser muß frei von Kohlensäure und daher nach *L. Michaelis*[1]) in einem alten oft gebrauchten Glaskolben ausgekocht sein. Zur Herstellung der erforderlichen Aminosäurevergleichslösungen bereitet man sich zweckmäßig erst Lösungen, die 100 mg Aminosäurestickstoff im Liter enthalten. Dazu sind abzuwägen für 500 ccm:

Bei Asparaginsäure	0,4753 g
„ Alanin	0,3179 „
„ Leucin	0,4678 „
„ Glykokoll	0,2678 „

Aus diesen Lösungen werden durch Verdünnen von 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4 und 3 ccm auf 100 ccm die einzelnen Vergleichskonzentrationen hergestellt. In den meisten Fällen wird man mit Asparaginsäure als Vergleichslösung aus-

[1]) *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914, S. 171.

kommen. Liegen zur Untersuchung unbekannte Aminosäuren vor, so ist bei etwa auftretenden geringen Farbunterschieden die Vergleichslösung entsprechend zu wählen. Um eine Zersetzung der Vergleichslösungen zu verhindern, empfiehlt es sich, dieselbe mit Toluol zu überschichten und im Eisschrank aufzubewahren. Es wurde festgestellt, daß derartig aufbewahrte Lösungen sich nach 2 Monaten noch nicht verändert hatten. Jedoch ist bei der jeweiligen Entnahme der mit Toluol konservierten Vergleichslösungen darauf zu achten, daß kein Toluol mit entnommen wird; man erreicht dies, indem man mit der oben verschlossenen Pipette die Toluolschicht rasch durchstößt und die Pipette bis fast auf den Boden des Gefäßes bringt. Die als Puffer und mit Neutralrot versetzt als Vergleichslösung bei der Neutralisation dienende Phosphatmischung $H^{\cdot} = 10^{-6,976}$ bereitet man aus den $^{m}/_{15}$-Kaliumphosphat- und Natriumphosphatlösungen durch Mischen derselben im Verhältnis 2 : 3. Diese Phosphatmischung ist zweckmäßig aus den $^{m}/_{15}$-Stammlösungen jedesmal frisch zu bereiten. Die Neutralrotlösung ist, in braunen Flaschen aufbewahrt, einige Zeit haltbar. Es empfiehlt sich jedoch, sie öfters zu erneuern. Auch die wässerige 0,1 proz. Ninhydrinlösung wird zweckmäßig jedesmal frisch bereitet, da sie sich nach einiger Zeit zersetzt. Sie ist in Fläschchen mit braunem Glase aufzubewahren. Das Ninhydrin wird von den Höchster Farbwerken in Ampullen von 0,1 g Inhalt geliefert; durch Auflösen dieser Menge in 10 ccm Wasser wird die 1 proz. Lösung erhalten. Zur Aufbewahrung der zur Neutralisation erforderlichen Lauge und Säuren dienen am besten Buretten.

Die Bestimmung des α-Aminostickstoffes gestaltet sich nun wie folgt: Je 2 ccm der Vergleichslösungen, der zu untersuchenden Lösung und der Phosphatmischung $H^{\cdot} = 10^{-6,976}$ werden in gut gereinigte trockene Reagensgläser pipettiert. Die zu untersuchende Lösung darf nicht mehr als 20 mg/l Aminosäurestickstoff aufweisen; bei höheren Gehalten ist entsprechend zu verdünnen. Liegen Lösungen vor, bei denen keine Anhaltspunkte über den annähernden Gehalt an Aminosäurestickstoff bestehen, so sind außer der unverdünnten Lösung auch die Verdünnungen 1 : 5, 1 : 25, 1 : 125 usw. zur Untersuchung heranzuziehen. Man gibt nun für alle Lösungen 0,05 ccm der Neutralrotlösung, schwenkt vorsichtig einmal um und stellt mit Lauge bzw. Säure auf die Färbung der Phosphatvergleichslösung ein. Bei den Aminosäurenvergleichslösungen bedarf es dazu nur weniger Tropfen $^{n}/_{400}$-Lauge; ist die $H^{\cdot}$-Konzentration der zu untersuchenden Lösung unbekannt, so ermittelt man zunächst durch einen Vorversuch die zur Neutralisation erforderliche Menge an Lauge oder Säure. Dann verfährt man zweckmäßig so, daß je nach der Wasserstoffionenkonzentration tropfenweise $^{n}/_{10}$-, $^{n}/_{100}$- oder $^{n}/_{400}$-Lauge bzw. Säure bis zum Farbumschlag zugegeben werden; wurden $^{n}/_{10}$- oder $^{n}/_{100}$-Lösungen verwendet, so ist mit der nächst schwächeren Lösung bis zum neuen Farbumschlag zurückzutitrieren, bis mit $^{n}/_{400}$-Lösung die Neutralisation endgültig erreicht ist. In den meisten Fällen läßt sich mit 1 Tropfen $^{n}/_{400}$-Lauge oder Säure der Farbton der Vergleichslösung genau einstellen. Bei der Neutralisation ist darauf zu achten, daß die Mischungen durch dieselbe eine nicht zu große Volumenzunahme erfahren, um zu große Verdünnungen dieser Mischungen zu vermeiden. Zu den so neutralisierten Lösungen gibt man dann je 2 ccm der Phosphatmischung sowie je 1 ccm der 1 proz. Ninhydrinlösung, schüttelt gut um und bringt die Reagensgläser in einem Einsatz in ein lebhaft siedendes Wasserbad. Es wird solange erhitzt, bis die 3 mg/l Aminosäurestickstoff enthaltende Vergleichslösung eben anfängt, sich blauviolett zu färben (gewöhnlich nach $^{1}/_{2}$stündigem Erhitzen); man überzeugt sich davon, indem man den Einsatz aus dem Wasserbade heraushebt und die Färbungen betrachtet; einzelne Reagensgläser dürfen während des Erhitzens nicht, auch nur vorübergehend, aus dem Wasserbade genommen werden, da, wie wir früher sahen, die Ninhydrinreaktion in starkem Maße abhängig ist von der Zeit der Erhitzung. Nach dem Erhitzen werden die Reaktionsmischungen bei gewöhnlicher Temperatur

abgekühlt und nach 1/2stündigem Stehen in Standzylindern aus farblosem Glas und genau gleicher Einteilung auf 100 ccm verdünnt. Auf weißem Hintergrund wird dann an Hand der Vergleichsfärbungen der Gehalt der zu untersuchenden Lösung an Aminosäurestickstoff festgestellt.

II. Die praktische Anwendung der quantitativen Ninhydrinmethode.

Zunächst wurde das Verhalten einer Anzahl Verbindungen gegenüber Ninhydrin geprüft. Bekanntlich bilden sich bei der Eiweißspaltung und Eiweißzersetzung außer den Aminosäuren Spaltungsprodukte verschiedener Art; vor allem Ammoniak, Amine (bei der Fäulnis), Aldehyde und Ketone, Säuren, Harnstoff, Indol, Skatol usw. *E. Abderhalden* und *H. Schmidt*, ferner *W. Halle*, *E. Löwenstein* und *E. Pribram* sowie *Neuberg* und *Herzfeld* haben, wie im Anfange dieser Arbeit berichtet, in dieser Richtung schon eingehendere Untersuchungen angestellt. Jedoch erschien eine Nachkontrolle dieser Resultate auf den Grundlagen der im vorigen Abschnitt genau studierten Ninhydrinreaktion wünschenswert, besonders was das Verhalten der Ammoniumverbindungen und Amine betrifft. Weiterhin erstreckte sich diese Untersuchung auch auf einige Verbindungen, deren Vorhandensein bei den späteren Versuchen eine Kenntnis ihres Verhaltens zum Ninhydrin notwendig erscheinen ließ. Das Ergebnis dieser Feststellung ist in der folgenden Tabelle angegeben; das + Zeichen bedeutet, daß sich ein blauvioletter Farbstoff gebildet hat.

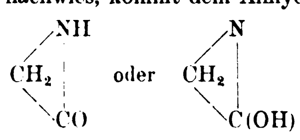
Prolin —, Phenylglycin —, Harnstoff —, Acetamid —, Kreatinin —, Xanthin —, Äthylamin +, Trimethylamin +, Benzylamin +, Diphenylamin —, Anilinchlorhydrat —, Benzidin —, Ammonchlorid +, Ammonsulfat +, Ammonacetat +, Ammoncarbonat +, Ammonlactat +, Ammonoxalat +, Ammonnitrat +, β-Alanin +, Formaldehyd —, Acetaldehyd —, Aceton —, Milchsäure —, Cholesterin —, Lactose — (gelb; in der Wärme gelblich braun), Maltose — (gelb; in der Wärme gelblich-braun), Arabinose — (gelb; in der Wärme gelblich-braun), Lävulose — (gelblich-braun; in der Wärme rötlich-braun), Glucose — (gelb; in der Wärme gelblich-braun), Saccharose — (gelb; in der Wärme gelblich-braun).

Auffallend ist zunächst das Verhalten der Ammonuimsalze und Amine. Die Angaben von *Abderhalden* und *Schmidt* sowie von *Ruhemann* und *Halle*, *Löwenstein* und *Pribram*, daß bei ammoniakalischen Lösungen keine Blaufärbungen beobachtet werden, sondern nur Rot- bzw. Violettfärbungen, fand ich nicht bestätigt; in all den Fällen trat die starke für die Aminosäuren charakteristische Blauviolettfärbung ein, ein Umstand, auf den übrigens schon *C. Neuberg* aufmerksam macht.

Auch die Amine: Äthylamin, Trimethylamin und Benzylamin geben die charakteristische Blaufärbung; dagegen wurde mit Anilin, Benzidin und Diphenylamin keine Reaktion erhalten. Es hat somit den Anschein, als ob die direkt am Benzolkern sitzenden NH_2-Gruppen nicht mit Ninhydrin reagieren, während in den Fällen, in denen aliphatische Amine vorliegen oder in denen die NH_2-Gruppe in der Seitenkette sitzt,

eine Färbung eintritt. So werden mit Äthylamin, Benzylamin und auch Trimethylamin positive Reaktionen erhalten, während Anilin, Benzidin und Diphenylamin keine Reaktion geben. Die Fähigkeit, den Farbstoff zu bilden, verschwindet ferner, wenn ein Wasserstoffatom der NH_2-Gruppe durch Phenyl ersetzt wird; wird dagegen statt des Phenyls die Methylgruppe eingesetzt, so tritt die Farbstoffbildung wieder ein. Als Beweis dafür dient das Verhalten des Phenylglycins und des Sarkosins. Das Phenylglycin mit der Formel $COOH-CH_2-NH-C_6H_5$ gibt keine Reaktion, während das Sarkosin, das die Formel $COOH-CH_2-NH-CH_3$ besitzt, kräftig Farbstoff bildet. Da ferner, wie das Verhalten des Harnstoffs und Acetamids zeigt, die Säureamide keine Reaktion geben, so läßt sich an Hand der Peptide, die nach *Abderhalden* mit Ninhydrin einen blauvioletten Farbstoff bilden, zeigen, daß die Stellung der NH_2-Gruppe zur COOH-Gruppe ohne Einfluß ist.

In den Peptiden sind bekanntlich die Aminosäuren als Säureamide so miteinander vereinigt, daß das entstehende Peptid selbst wieder eine Aminosäure ist. Da nun der Amidstickstoff, d. h. der Stickstoff der Gruppe $-C \cdot O \cdot NH-$ nicht reagiert, kann die Farbstoffbildung nur auf die Anwesenheit der NH_2-Gruppe, die sich z. B. im Falle des Glycylglycins in der Glycylgruppe befindet, zurückzuführen sein. Die Stellung dieser NH_2-Gruppe zur Carboxylgruppe ist aber bei den einzelnen Peptiden verschieden. Übrigens gibt auch β-Alanin die charakteristische Blauviolettfärbung. Das negative Verhalten der Aminosäurenanhydride, wie es *Abderhalden* beobachtete, dürfte seinen Grund in der Bildung eines inneren Anhydrides haben. Wie *Th. Curtius* nachwies, kommt dem Anhydrid des Glycins die Formel



zu bzw. bildet sich durch Zusammentritt zweier Moleküle Glycin, eine Verbindung von folgender Zusammensetzung:

$$CH_2 \begin{matrix} \diagup NH-CO \diagdown \\ \diagdown CO-NH \diagup \end{matrix} CH_2 .$$

Nach den gemachten Erfahrungen wird aber bei einer derartigen Stickstoffverbindung keine positive Ninhydrinreaktion erhalten.

Auch die Iminogruppe reagiert, wie das Verhalten des Prolins zeigt, nicht; ebensowenig die Gruppe $NH = C <$, wie sie zum Beispiel das Kreatinin aufweist. Ebenso verhalten sich negativ die Aldehyde und Ketone, die Milchsäuren sowie Xanthin.

Die Zuckerarten geben beim Erhitzen mit Ninhydrin gelblich bis rötlichbraune Färbungen, die jedoch beim Erkalten auf einen gelben Farbton zurückgehen, also auf die Reaktion selbst ohne Einfluß sind. Immerhin können besonders bei der Anwesenheit größerer Zuckermengen bei der quantitativen Bestimmung des Aminosäurestickstoffes diese Gelbfärbungen die erhaltenen blauvioletten Farbtöne dunkler erscheinen

lassen und somit einen höheren Gehalt an Aminosäurestickstoff vortäuschen; in einer 2proz. Milchzuckerlösung, die 10 mg Aminosäurestickstoff im Liter enthielt, fand ich mit der Ninhydridmethode statt 10 mg 11 mg Stickstoff im Liter; der Fehler, der durch die Anwesenheit geringer Zuckermengen entsteht, ist somit nicht sehr beträchtlich; immerhin verdient dieses Verhalten der Zuckerarten Beachtung.

Um die Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion den Ammoniumverbindungen und Aminen gegenüber festzustellen, stellte ich von den erwähnten Substanzen Lösungen her, die 20 mg Stickstoff im Liter entsprachen und führte dann die Ninhydrinreaktion aus. Von den Ammonverbindungen gab nur Ammonacetat eine schwache Blaufärbung, die etwa 4 mg Aminosäurestickstoff im Liter entsprach. In allen anderen Fällen verlief die Reaktion negativ; ebenso bei Äthylamin und Trimethylamin, während bei Benzylamin eine Färbung entstand, die etwas stärker als die mit Ammonacetat erhaltene war. Es zeigt sich somit, daß die untersuchten Ammoniumverbindungen und Amine wohl eine positive Ninhydrinreaktion geben, daß jedoch diesen Verbindungen gegenüber die Empfindlichkeit wesentlich geringer ist, als gegenüber den Aminosäuren. Bei der Anwesenheit kleiner Mengen der genannten Verbindungen (unter 15 mg Stickstoff im Liter) ist somit eine Beeinflussung der Bestimmung des Aminosäurestickstoffes nicht zu erwarten.

Aus den vorstehenden Ermittelungen ergibt sich, daß die Ninhydrinreaktion keineswegs für die Aminosäuren charakteristisch ist. Sie zeigt vielmehr das Vorhandensein von Ammoniumverbindungen und bestimmter Arten von Aminoverbindungen, zu denen auch die Aminosäuren gehören, an. Dabei scheint die Empfindlichkeit der Reaktion der verschiedenen Arten der Verbindungen gegenüber verschieden zu sein. Es hat sich gezeigt, daß die Empfindlichkeit bei den α-Aminosäuren gleich ist, daß sie aber schon dem β-Alanin gegenüber weit geringer ist; ebenso verhält es sich bei den Aminen und Ammoniumverbindungen, bei denen ja, wie erwähnt, noch 15 mg im Liter Stickstoff keine Reaktion gaben.

Da Ninhydrin auch mit Eiweißstoffen Blauviolettfärbung gibt, ist es für die Praxis der Ninhydrinmethode von größter Wichtigkeit, daß die zu untersuchende Lösung vollständig eiweißfrei ist. In allen Fällen, in denen Eiweiß vorhanden ist, ist daher der Herstellung einer absolut eiweißfreien Lösung größte Aufmerksamkeit zu schenken. Nachdem ich festgestellt hatte, daß bei den nach den üblichen Verfahren hergestellten Seren entweder die Eiweißstoffe für das empfindliche Ninhydrinverfahren nicht vollständig genug entfernt wurden oder aber die verwendeten Eiweißfällungsmittel das später notwendige genaue Neutralisieren sehr erschwerten, wenn nicht überhaupt unmöglich machten, wählte ich in Anlehnung an die von *Abderhalden* bei seiner Schwanger-

schaftsreaktion zum Nachweis blutfremder Stoffe mittels des Dialysierverfahrens gemachten Angaben ebenfalls diese Methode zur Entfernung der Eiweißstoffe. Dieses Verfahren hat allerdings den Nachteil, daß es längere Zeit in Anspruch nimmt, da nach meinen an Aminosäurelösungen bekannter Konzentrationen gemachten Feststellungen erst nach etwa 48stündigem Stehen die Aminosäurekonzentration der Außenflüssigkeit der der Innenflüssigkeit entsprach. Um das Verfahren abzukürzen, stellte ich mit verschiedenen Hülsen die Menge Aminosäurestickstoff fest, die schon nach 24 Stunden dialysiert war und fand als Durchschnittswert die Zahl 1,3, mit der der auf die Menge der angewandten Substanz berechnete Aminosäurestickstoffgehalt zu multiplizieren ist, um den absoluten Aminosäurestickstoffwert zu erhalten. Wenn dieses Verfahren auch keineswegs ganz genau ist, so werden die gefundenen Resultate den tatsächlich vorhandenen Aminosäuremengen doch sehr nahe kommen. Zuverlässige Resultate werden natürlich bei der Verarbeitung eiweißfreier Ultrafiltrate erhalten.

Auf Grund der Ergebnisse, die das Studium den Ninhydrinreaktion gezeitigt hat, läßt sich somit über die vermutliche praktische Anwendung derselben folgendes sagen:

1. In Lösungen, die keine Eiweißstoffe und keine oder nur geringe Mengen Amine enthalten, wird die Methode den Aminosäuregehalt überaus exakt angeben.

2. In Lösungen, die ebenfalls keine oder nur geringe Mengen Amine, daneben aber auch Eiweißstoffe enthalten, bei denen aber die Entfernung der Eiweißstoffe durch das Dialysierverfahren notwendig ist, wird mit Hilfe eines ermittelten Dialysierfaktors der Gehalt der Aminosäuren mit einer für die meisten Fälle genügend großen Genauigkeit bestimmt werden können. Besonders in Fällen, wie zum Beispiel beim Studium der Eiweißzersetzung, wo es darauf ankommt, die Bildung der Aminosäuren laufend zu verfolgen, bei denen also unter Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen Vergleichswerte an Stelle von absoluten Werten treten können, wird die Ninhydrinmethode ausgezeichnete Dienste leisten. Die Anwendung von Ultrafiltraten ermöglicht eine einwandfreie Bestimmung des absoluten Aminosäurestickstoffwertes.

3. In Lösungen, die größere Mengen Amine enthalten, wird die, wie *Neuberg* fand, positiv ausfallende Ninhydrinmethode nicht mehr den Gehalt an Aminosäurestickstoff allein, sondern den Stickstoffgehalt aller eine positive Ninhydrinreaktion gebender Eiweißspaltungsprodukte angeben. Da aber, wie wir gesehen haben, die Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion den verschiedenen Arten der Aminoverbindungen gegenüber verschieden ist, so werden die gewonnenen Resultate natürlich nur Vergleichswerte darstellen.

Wie die vorstehenden Erörterungen zeigen, bildet die quantitative colorimetrische Ninhydrinreaktion ein brauchbares Verfahren zur Bestimmung des Aminosäurenstickstoffgehaltes. Es wird auf zahlreichen Gebieten, so z. B. in der Physiologie, der Bakteriologie und der Nahrungsmittelchemie mit Erfolg verwendet werden können, besonders dann, wenn es sich um den exakten Nachweis verhältnismäßig kleiner Mengen Aminosäurenstickstoff handelt.

Ich möchte hier vor allem an den biologischen Schwangerschaftsnachweis nach *Abderhalden* erinnern, bei dem bekanntlich die Aminosäuren mittels der Ninhydrinreaktion nachgewiesen werden. Dieser biologische Schwangerschaftsnachweis wird stark angefochten, da mit ihm keineswegs eindeutige Resultate erhalten wurden. Wie aus der vorliegenden Arbeit hervorgeht, dürften die Mißerfolge in der Hauptsache auf den Nachweis der Aminosäuren an sich zurückzuführen sein. Das Neutralisieren der zu untersuchenden Lösung allein genügt nicht; vielmehr ist, wie ich gezeigt habe, die Ninhydrinreaktion in so außerordentlich hohem Maße abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration, daß selbst nur kleine Änderungen derselben, wie sie beim Erhitzen durch Hydrolyse eintreten können, die Reaktion besonders bei Anwesenheit nur geringer Mengen Aminosäuren vollständig verhindern können. Da es sich außerdem, wie *Herzfeld* beobachtete, bei positiven und negativen Schwangerschaftsreaktionen nicht um qualitative, sondern um quantitative Unterschiede der Aminosäuren zu handeln scheint und das colorimetrische Ninhydrinverfahren auch einen exakten quantitativen Nachweis des Aminosäurestickstoffes ermöglicht, so gibt die vorliegende Arbeit vielleicht Anregung zu einer Nachprüfung des biologischen Schwangerschaftsnachweises auf Grund des neuen colorimetrischen Ninhydrinverfahrens.

Über die chemische Wirkung des Labfermentes*).

Von

G. S. Inichoff.

(Aus dem Milchwirtschaftlichen Institut zu Wologda.)

(Eingegangen am 10. April 1922.)

1872 sprach *Hammersten* als erster den Gedanken aus, daß die Wirkung des Labfermentes nicht in der Ausscheidung von Eiweißstoffen der Milch besteht, sondern ganz eigenartig vor sich geht und zwar wird die Fällung des koagulierten Paracaseins durch Calciumsalze hervorgerufen, welche sich in der Milch vorfinden.

Seine Erklärung bestand darin, daß das Casein der Milch bei Einwirkung von Labferment auf dieselbe in zweierlei Arten von Molekülen gespalten wird — große (Käse), welche unter der Einwirkung der löslichen Calciumsalze der Milch in den unlöslichen Zustand übergehen, dabei ein Koagulum bildend (Paracasein) und kleinere — in der Lösung verbleibend, sogenanntes Molkeneiweiß.

Nach den Arbeiten von *Hammersten* über die chemische Wirkung des Labfermentes haben sich mit der Frage eine Reihe von Forschern beschäftigt, wie *Freudenreich*[1]), *Fuld*[2]), *Benjamin*[3]), *Bang*[4]), jedoch haben letztere kaum bedeutende Änderungen in die von *Hammersten* ausgesprochene Anschauung eingeführt. Andere Forscher versuchen, um die spaltende Wirkung des Labfermentes zu beweisen, die Frage zu erläutern, indem sie das Casein und seine Zerfallprodukte studierten. Bis jetzt ist die Frage der Gleichwertigkeit des Caseins, des Paracaseins und des Molkeneiweißes noch nicht entschieden, obgleich in dieser Richtung eine Anzahl von Arbeiten vorliegen. *Kikkoji*[5]) fand im Paracasein dieselbe P-Menge wie im Casein. *Raudnitz*[6]), *Schmidt-Nielsen, Lundberg*[7]), *Loevenhardt*[8]) weisen daraufhin, daß sich das Casein und Paracasein verschiedenen Fällungs- und Lösungsmitteln gegenüber nicht gleich verhalten. Paracasein, falls es in gesättigter Kalklösung gelöst und durch Phosphorsäure neutralisiert ist, läßt sich durch Einwirkung von Labferment nicht fällen, worauf *Hammersten* und *Kikkoji* hinweisen.

Die Elementaranalyse des Caseins, Paracaseins und des Molkeneiweißes, ausgeführt von *Makris*[9]) (1876), *Hammersten*[10]) (1883—1885), *Chittenden, Painter*[11]) (1887), *Lehmann*[12]) (1894), *Ellenberg*[13]) (1902), *Laquer*[14]) (1903), *Burow*[15]) (1905), *Fange*[16]) (1908), *van Slyke*[17]) (1913), *Kikkoji*[18]) (1909) gab keine bestimmten Resultate, was wohl auf die Fehler der Methodik und die Schwierigkeit der Herstellung reiner

*) Auf persönliche Bitte des Verfassers übersetzt von cand. chem. *P. Sperrlingk.*

Präparate zurückzuführen ist. Von all diesen Arbeiten verdient die größte Beachtung die 1913 genau ausgeführte Analyse von *van Slyke*, aus welcher die Gleichwertigkeit der Elementarzusammensetzung des Caseins und des Paracaseins hervorgeht. 1914 führte *A. Geane*[19]) die Elementaranalyse aus und bestimmte im Casein und Paracasein die *Hausmann*sche Zahl, wobei er, um genaue Daten zu erhalten, seine Forschungsarbeiten mit allem nötigen Zubehör ausstattete. Ein Unterschied zwischen Casein und Paracasein (nach der Nomenklatur englischer Forscher wird Casein als Caseinogen bezeichnet, Paracasein aber — als Casein) ist von *A. Geane* kaum festgestellt worden.

Diese Arbeit verdient Beachtung und stimmt gut überein mit der von den englischen Chemikern *van Slyke* und *Bosworth*[20]) 1913 ausgesprochenen Voraussetzung, nach welcher die Wirkung des Labfermentes in einer Spaltung des Milchcaseins in 2 Moleküle Casein besteht, wobei jedes Molekül die halbe Größe des anfänglichen Moleküls darstellt, d. h. daß wir es hier nicht mit einem chemischen, sondern mit einem rein physikalischen Prozeß zu tun haben, mit einer Änderung des Dispersionsgrades in der Caseinlösung. Im Fall eines basischen Calciumcaseinats (enthaltend 4 Äquivalente Calcium) löst sich Casein in Wasser, bei Gegenwart aber geringer Mengen Chlorcalciums wird es unlöslich. Casein, welches 2 Äquivalente Calcium enthält, gibt ein in Wasser unlösliches Casein. Ist dem aber so, so muß das Casein in chemischer Beziehung dem Paracasein gleichwertig sein.

Im Grunde genommen unterscheidet sich die neue Theorie nicht viel von den schon in früheren Jahren von verschiedenen Forschern ausgesprochenen Ansichten, und zwar, daß dem Labferment spaltende Wirkung zukommt. Der Spaltungsakt selbst war nicht klar; nach der Vorstellung *Hammerstens* und anderer Forscher bezieht sich der Spaltungsakt auf das Caseinmolekül selbst. Jetzt sprechen wir gewöhnlich nicht von Molekülen, sondern von Eiweißkörpern, was es wahrscheinlich erscheinen läßt, daß die Wirkung des Labfermentes auf die Milch in einer Spaltung des Caseinaggregats besteht. Die fortschreitende Kolloidchemie beweist, daß das Caseinmolekül der Milch ein komplizierter Aggregatzustand des Eiweißkörpers ist, und daß der Dispersionsgrad erheblich das Löslichkeitsvermögen der Moleküle ändern kann; dieser Standpunkt über die Wirkung des Labfermentes wird bei weitem verständlicher.

Die Gleichwertigkeit von Casein, Paracasein und Molkeneiweiß beweist *Peroff*[21]) in einer im Jahre 1918 ausgeführten Arbeit, basierend auf der gleichen Säurezahl eiweißhaltiger Stoffe. Eine andere Arbeit zweier englischer Chemiker, *A. Harden* und *A. Macallum*[22]), welche fast zur selben Zeit wie die von *van Slyke* ausgeführt wurde, zeigt, daß der Übergang des Caseins in Paracasein unter der Einwirkung von Labferment mit einer Abspaltung von Stickstoff, Phosphor und Calcium begleitet ist.

Die Fällung des Paracaseins mit gelösten Calciumsalzen ist nicht mit der Bildung einer chemischen Verbindung in Einklang zu bringen, da sich ein Paracaseinniederschlag auch ohne Calciumsalze bilden kann, wenn die Lösung des Labfermentes genügend konzentriert gewählt wird. Casein, welches der Einwirkung von Enzymen unterworfen worden und nachher nochmals gelöst worden ist, läßt sich nicht durch Labferment fällen, selbst wenn dieselben Calciumsalze zugegen sind. Alles dieses spricht scheinbar für einen Unterschied der beiden Körper in chemischer Beziehung. Somit bleibt die Frage über die chemische Wirkung des Labfermentes noch immer offen. Meinen Versuchen zur Klärung

der sich abspielenden chemischen Prozesse bei der Bildung des Milchkoagulums durch Labferment legte ich folgende Gedanken zugrunde.

Wenn man voraussetzt, daß dem Labferment peptonisierende Eigenschaften zukommen, worauf von vielen Forschern hingewiesen wird, so müssen nach der Wirkung des Fermentes in der Lösung Polypeptide entstehen und die Zahl der Eiweißmoleküle wird größer sein müssen. Eine Methode zur Bestimmung der absoluten Anzahl von Eiweißmolekülen in Lösungen haben wir nicht, sind aber imstande, die in der Lösung zunehmenden Eiweißmoleküle nach den zunehmenden Carboxylgruppen durch Titration eiweißhaltiger Lösungen mit Alkali zu bestimmen, falls Aldehyde vor und nach der fermentativen Einwirkung zugegen sind. Wenn wir vom Säuregrad eiweißhaltiger Lösungen sprechen und die Größe des Säuregrades in Kubikzentimeter verbrauchter Alkalilösung ausdrücken, so bestimmen wir hiermit die Differenz der Carboxyl- und basischen Gruppen eiweißhaltiger Stoffe.

Casein reagiert auf Phenolphthalein sauer, weil in seinem Molekül die Säuregruppen vorherrschen.

Die Peptonisation eiweißhaltiger Stoffe hat keinen allgemeinen Säuregrad, weil die Differenz der sauren und basischen Gruppen dieselbe bleibt:

$$NH_2 - R - CO - NH - R_1 - COOH + H_2O = NH_2RCOOH + NH_2R_1COOH$$

Wenn es auf irgendeine Art gelänge, aus der Reaktionssphäre bei der Neutralisation die Säure- resp. basischen Gruppen auszuschalten, so müßte nach der Spaltung des Eiweißmoleküls die Zahl der zurückbleibenden Gruppen größer sein im Vergleich mit ihrer Zahl vor der Fermentwirkung.

Man kann wohl die basischen Gruppen des Eiweißmoleküls binden, wenn man sich der Reaktion von Aminen mit Aldehyden bedient, wie z. B. des Formaldehyds:

$$COOH - R - NH_2 + HCHO = COOH - R - N = CH_2 + H_2O.$$

Falls man Formalin zu einer Lösung von Eiweiß oder Milch hinzugibt, lassen sich somit die Amingruppen ausschalten und der Säuregrad der Lösung steigt. Wenn wir jetzt Formalin in die eiweißhaltige Lösung vor und nach dem Labferment einführen, so bekommen wir im Fall peptonisierender Eigenschaften des Fermentes einen sich vergrößernden Säuregrad. Wenn wir diese Methode auf Milch und Caseinlösungen anwenden, in welchen Paracasein ausfällt, stoßen wir auf einige Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Säuregrades von koaguliertem Paracasein, da selbst das fein verriebene Paracasein sehr langsam neutralisiert wird — und letzteres kann Anlaß zu Fehlern geben (Versuch Nr. 50).

Die Lösung des Koagulums (Versuche Nr. 51, 52 und 62) in neutralen Salzlösungen wie fluorsaurem Natrium, citronensaurem und salicylsaurem Natrium und anderen gab keine befriedigenden Resultate, weil sich Paracasein schwer löst, weshalb Erwärmung notwendig ist; letzteres aber macht den Caseinzerfall wahrscheinlich. Infolgedessen ging ich bei der nächsten Serie von Versuchen (Nr. 64 und 65) von dem Gedanken aus, so zu arbeiten, daß durch die Wirkung des Labfermentes das Paracasein nicht ausfällt. Letztere Bedingungen sind durch Hinzufügung oxalsaurer Salze zur Eiweißlösung leicht zu erreichen und zugleich werden die Wasserstoffionen verringert; ebenso wirken Calciumsalze und Labferment auf stark abgekühlte Lösungen (0°—2°).

Die Versuche wurden in Milchproben oder Caseinlösungen in Kalkmilch ausgeführt. Die Impfung der Proben wurde mit Labferment vorgenommen, welches im Laboratorium selbst hergestellt worden war. Die Lösung des Labfermentes wurde durch Auflösung von 0,3 g Ferment in 100 ccm Wasser vorgenommen. Die labwirkende Kraft des Fermentes war 100 000, d. h. daß ein Teil vom genannten Ferment war imstande, bei 35° in 40 Minuten 100 000 Teile normaler Milch zur Koagulation zu bringen.

Die wirkende Kraft des Fermentes wurde durch eine genau qualifizierte Caseinlösung nach der Methode von *Inichoff*[23]) bestimmt.

Versuch Nr. 50.

Proben	Milch ccm	Formalin ccm	Labferment ccm	$^n/_{10}$-Alkali ccm
1	25	2	—	8,40
2	25	2	1,0	8,40
3	25	2	—	8,45
4	25	2	1,0	8,40
5	50	2	—	16,45
6	50	2	1,0	16,75

Das koagulierte Paracasein wurde fein zerrieben und in diesem Zustande unter fortgesetzter Zerreibung mit Alkali neutralisiert. Trotz der peinlichsten Ausführung der genannten Prozedur ist das Zurückbleiben von kleinen Klümpchen nicht ausgeschlossen, wodurch ein gewisser Fehler in der Bestimmung des Säuregrades bedingt sein kann. Die Versuche ergeben eine unbedeutende Steigerung des Säuregrades in Milchlösungen, Probe Nr. 6, welche der Fermentwirkung ausgesetzt waren. Andere Proben, Versuche Nr. 51, 52 und 62, blieben unverändert. Das gebildete Paracaseinkoagulum löste sich in salicylsaurem Natrium, in einer Mischung organischer Säuren (Lösung Neu-Sal) und in fluorsaurem Natrium. Zu einer jeden Probe wurden à 2 ccm Formalin hinzugegeben.

Versuche	Proben	Milch ccm	Lösungsmittel ccm		Labferment ccm	$^n/_{10}$-Alkali ccm
51	1	25	Salicylsaures Na	5,0	—	8,85
51	2	25	„ „	5,0	1,0	9,15
51	3	25	Neu-Sal	10,0	—	9,65
51	4	25	„	10,0	1,0	9,85
52	5	50	3 proz. NaF	25,0	—	18,50
52	6	50	3 „ „	25,0	1,0	18,35
52	7	50	3 „ „	25,0	—	13,80
52	8	50	3 „ „	25,0	1,0	14,05
62	9	50	4 „ „	10,0	—	12,65
62	10	50	4 „ „	10,0	1,0	12,55

Die Lösung des Koagulums in salicylsaurem Natrium und fluorsaurem Natrium geht langsam vonstatten; um Lösung mit salicylsaurem Natrium zu erzielen, war sogar ein Zerreiben erforderlich. In allen Versuchen mit Ausnahme eines Nr. 62 läßt sich eine geringe Steigerung des Säuregrades konstatieren, nachdem man die Milch mit Labferment geimpft hat.

Die Schwankungen des Säuregrades sind so unbedeutend, daß man wohl kaum von einer Peptonisation des Caseins reden kann. Die Methodik in 2 Parallelversuchen läßt einen bedeutend größeren Unterschied zu. Versuch Nr. 64 und 65. Da sich nach Ausscheidung des Paracaseins das Molkeneiweiß verändern kann, wurde eine Reihe von Versuchen mit bis auf 0° abgekühlter und geimpfter Milch vorgenommen; bei dieser Behandlung bildete sich im Verlauf von 24 Stunden kein Koagulum. Erwärmte man aber solche Proben bis auf 35°, so bildete sich sofort das Koagulum. Zur Untersuchung wurden 50 ccm Milch genommen; vor der Bestimmung des Säuregrades wurden à 2 ccm Formalin (40%) hinzugefügt.

Versuche	Proben	Im Kälteraum gehalten	Lablösung ccm		$^n/_{10}$-Alkali ccm
64	1	6 Stunden	—		14,95
64	2	6 „	4,0		15,15
64	3	6 „	—		14,85
64	4	6 „	4,0		15,00
64	5	22 „	—		14,95
64	6	22 „	4,0		15,10
64	7	22 „	4,0		15,25
65	8	20 „	—		15,65
65	9	20 „	4,0		15,70
65	10	20 „	4,0		15,90
65	11	20 „	4,0		15,65
65	8—11	— „	—	im Mittel:	15,75
65	12	20 „	4,0		15,80
65	13	20 „	4,0		16,10
65	14	20 „	4,0		16,20
65	15	20 „	—		16,05
65	12—15	— „	—	im Mittel:	16,04

Milchproben, welche der Labfermentwirkung ausgesetzt waren, zeigten eine geringe Steigerung des Säuregrades, welcher nicht genügend auf eine Peptonisation des Caseins hinweist, aber durch den Zerfall des Aggregatzustandes des Caseinmoleküles erklärt werden kann; daher geht auch die Neutralisationsreaktion leichter vonstatten. Falls im Aggregatzustande das Casein aus einer größeren Anzahl von Molekülen besteht, so wird die Neutralisation der Carboxylgruppen langsamer vonstatten gehen als in Partikeln mit einer kleineren Molekülzahl: letzteres aber kann zu einer verschiedenen Endreaktion bei der Neutralisation führen, da bei der Neutralisation der Milch, wenn als Indicator Phenolphthalein benutzt wird, sich eine beständig bleibende Rosafärbung nicht erreichen läßt, wohl aber läßt sich der Moment der Rosafärbung fixieren, obgleich die entstandene Färbung nur eine bestimmte kurze Zeit anhält.

Versuche Nr. 63 und 66.

Die Milchproben wurden in Schnee gekühlt und zugleich wurde die Menge und der Konzentrationsgrad des Labfermentes geändert. Zur Untersuchung wurden 25 ccm Milch genommen und Formalin à 1 ccm hinzugefügt.

Versuche	Proben	Labferment Konz.	ccm	Temp.	Zeitintervall der Wirkungsdauer	Säuregrad nach *Törner*
9. XI.	1	0,3 %	—	2,0°	24 Stunden	26,5°
9. XI.	2	0,3 %	1	2,0°	24	27,0°
9. XI.	3	0,3 %	2	2,0°	24	27,0°
9. XI.	4	0,3 %	3	2,0°	24	26,5°
9. XI.	5	0,3 %	4	2,0°	24	27,0°
10. XI.	6	0,3 %	1	2,0°	10	22,0°
10. XI.	7	3,0 %	—	2,0°	10	22,0°
10. XI.	8	3,0 %	1	2,0°	10	22,5°
10. XI.	9	3,0 %	2	2,0°	10	22,0°
10. XI.	10	3,0 %	3	2,0°	10	22,5°
10. XI.	11	3,0 %	4	2,0°	10	22,0°
10. XI.	12	3,0 %	4	2,0°	24	22,0°

Der Säuregrad wird durch Hinzufügung größerer Mengen Labfermentes nicht erhöht; Versuch Nr. 11, in welchem die hinzugefügte Fermentmenge 40 mal größer war als im Versuch Nr. 6, gab denselben Säuregrad. Die Wirkung des Labfermentes selbst bei längerer Einwirkung übt keinen Einfluß auf den Säuregrad aus (Proben Nr. 11 und 12).

Versuch Nr. 67.

Bei diesem Versuche wurden zur Milch oxalsaure Salze hinzugefügt, wodurch die Calciumsalze gefällt und die Konzentration der Wasserstoffionen zurückgedrängt wurde. Die veränderte Sphäre der Reaktion und die veränderte Menge der gelösten Calciumsalze bewirken, daß das sich in Lösung befindliche Paracasein nicht zur Koagulation gebracht

werden kann, sich also auch kein Niederschlag bilden kann*). Zum Versuch wurden 50 ccm Milch, 50 ccm H_2O und 5 ccm $Na_2C_2O_4$ genommen und unmittelbar vor der Bestimmung des Säuregrades wurden noch à 2 ccm Formalin hinzugefügt. Die Versuche wurden bei 35° ausgeführt.

Proben Nr.	Labferment ccm	Zeitintervall der Wirkungsdauer des Labfermentes	Säuregrad
1	2,0	1 Stunde	12,0
2	—	1 „	12,2
3	2,0	2 Stunden	12,0
4	2,0	3 „	12,1
5	—	3 „	12,2

Eine Steigerung des Säuregrades in den geimpften Milchproben läßt sich nicht beobachten. Eine unbedeutende Verringerung des Säuregrades muß wohl auf die Methodik der Bestimmung selbst bezogen werden.

Versuch Nr. 92.

Anstatt oxalsauren Natriums wurde oxalsaures Ammonium (5,0%) verwendet. Zu jeder Probe wurden 25 ccm Milch, 2 ccm $(NH_4)_2C_2O_4$ und 25 ccm H_2O genommen. Das Labferment wurde der in Schnee gekühlten Milch hinzugegeben und bei dieser Temperatur auf 24 Stunden beiseite gestellt. Vor der Bestimmung des Säuregrades wurde 1 ccm Formalin hinzugefügt. Die Proben ohne Labferment wurden ebenso behandelt.

Proben Nr.	Temperatur d. Versuches	Labferment ccm	Säuregrad	Koagulum
1	1°	—	20,0	keine Bildung
2	1°	1,0	20,0	„ „
3	1°	1,0	19,0	„ „
4	1°	1,0	19,0	„ „
5	1°	—	19,0	„ „
6	35,0°	1,0	—	in 6 Minuten
7	35,0°	—	19,0	keine Bildung

Somit läßt sich kein Unterschied des Säuregrades konstatieren, ganz ungeachtet dessen, ob die Milch im Verlauf von 24 Stunden der Einwirkung des Labfermentes ausgesetzt worden war oder nicht.

Versuch Nr. 93.

In den auf Zimmertemperatur gebrachten Milchproben wurde nur das Zeitintervall der Wirkungsdauer des Labfermentes geändert. Der

---

*) 1 ccm $K_2C_2O_4 \cdot 4\,H_2O$ (3 proz.) zu 10 ccm Milch hinzugefügt drückt die Konzentration der Wasserstoffionen von $0{,}19 \cdot 10^{-6}$ N auf $0{,}06 \cdot 10^{-6}$ (p_H 6,70 bis 7,22) zurück d. h. die Milch wird dadurch außerhalb der Koagulationszone von *Michaëlis* gestellt.

anfängliche Säuregrad der Milch war 10° nach *Törner*. Zu jeder Probe wurden 25 ccm Milch, 25 ccm H_2O, 2 ccm $Na_2C_2O_4$ und 1 ccm Formalin genommen.

Proben Nr.	Labferment	Zeitintervall der Wirkungsdauer des Labfermentes	Säuregrad
1	—	—	16,0
2	1,0	10 Minuten	17,0
3	—	10 „	17,0
4	1.0	1 Stunde	17,0
5	1,0	16 Stunden	17,0
6	1,0	24 „	17,0
7	1,0	24 „	17,0

Das verschiedene Zeitintervall der Wirkungsdauer des Labfermentes übt keinen Einfluß auf den Säuregrad der mit Formalin versetzten Milch aus.

Versuche Nr. 94, 95 und 96.

Zu den Versuchen wurden 25 ccm Milch, 2 ccm $Na_2C_2O_4$ und 1 ccm Formalin genommen. Geändert wurden: Die Menge des Labfermentes, seine Konzentration, der anfängliche Säuregrad der Milch und die Temperatur.

Versuche	Proben Nr.	Labferment Konz.	ccm	Temperatur	Zeitintervall der Wirkungsdauer des Labfermentes	Säuregrad
94	1	0,3%	—	1,0°	24 Stunden	17 0
94	2	0,3	1	1,0°	24 „	17,0
94	3	0,3 „	2	1,0°	24 „	17.0
94	4	0,3 „	3	1.0°	24 „	17,0
94	5	0,3 „	4	1.0°	24 „	17,0
95	6	2,0 „	—	15,0°	1 „	16.0
95	7	2,0 „	1	15.0°	1 „	16,0
95	8	2.0 „	1	15,0°	2 „	16,0
95	9	2,0 „	1	15,0°	3 „	16,0
95	10	2,0 „	1	15,0°	16 „	16,0
95	11	0,3 „	1	15.0°	16 „	16.0
96	12	3.0 „	—	15,0°	1 „	18.0
96	13	3,0 „	1	15,0°	1 „	18,0
96	14	3,0 „	1	15,0°	3 „	18.0
96	15	3,0 „	1	15,0°	5 „	18,0
96	16	0,3 „	1	15,0°	5 „	18,0

Selbst die vergrößerte Menge und der verschiedene Zeitintervall der Wirkungsdauer des Labfermentes üben keinen Einfluß auf den Säuregrad der mit Formalin versetzten Milch aus, obgleich man erwarten könnte, daß bei peptonisierender Wirkung des Labfermentes sich der Säuregrad ändern müßte. Folglich liegt hier keine spaltende Wirkung des Labfermentes vor. Zu denselben Resultaten kommt *T. Milroy*[24]), indem er die Konzentration der Wasserstoffionen im Fermentations-

prozesse der Milch mit oxalsaurem Kalium bestimmt. Zur Untersuchung wurden zu 10 ccm Milch 1 ccm $K_2C_2O_4$, 1 ccm Lablösung (0,25 proz), 0,75 ccm 1 proz. $CaCl_2$ hinzugefügt und alles bei 38° in den Thermostaten gestellt.

Zeitintervall der Wirkungsdauer des Labfermentes	$(H) \cdot 10^{-6} \cdot N$	p_H	Anmerkung
1 Minute	0,7103	6,46	Flüssigkeit
2 Minuten	0,7110	6,46	„
5 „	0,7127	6,49	koagulierte
10 „	0,7135	6,50	verdickte sich
15 „	0,7135	6,50	„ „
30 „	0,7135	6,50	„ „

Diese Zahlen sprechen dafür, daß im Anfangsstadium der Wirkung des Labfermentes bis zur Koagulationsbildung sich keine Änderung in der Konzentration der Wasserstoffionen bemerken läßt; bei der Einwirkung von Pepsin steht letzteres außer Frage. Der Übergang der flüssigen Phase in die Phase der Koagulationsbildung des Caseins ist nicht mit einer Änderung der Wasserstoffionen verbunden, was wohl daher rühren könnte, daß das gelöste Casein vom Calcium fixiert wird und daher auch eine erhöhte Menge Wasserstoffionen sich in der Flüssigkeit vorfinden.

Die ungemein komplizierten und nicht scharf genug charakterisierten chemischen Verbindungen, welche sich in der Milch vorfinden, machen die Entscheidung der Frage über die Änderungen des Säuregrades resp. der Konzentration der Wasserstoffionen in der Milch bei der Fermentwirkung sehr schwierig, weil eine Reihe von anderen chemischen Prozessen sich abspielen kann.

Um diese Möglichkeiten teilweise ausschalten zu können, wiederholte ich die Versuche nicht mit Milch, sondern mit in Kalkwasser gelöstem Casein. Die Caseinlösungen wurden wie folgt präpariert: 3 g Casein wurden in bei Zimmertemperatur gesättigter Kalklösung gelöst. Zur alkalisch reagierenden Flüssigkeit wurden 19 ccm $^n/_{10}$-HCl und 42 ccm H_2O hinzugefügt. Die erhaltene Lösung zeigte den Säuregrad 7 (als Indicator diente Phenolphthalein) und gab bei der Einwirkung von Labferment ein Koagulum. Bei einem Teil der Versuche wurde die Acidität der Lösung herabgedrückt auf 3—4°, wobei sich bei Hinzufügung von Labferment kein Paracaseinkoagulum bildete, wohl wegen der geringen Konzentration der Wasserstoffionen in der Lösung.

Versuche Nr. 83, 84, 85, 86 und 87.

Die Caseinlösung wurde mit einem geringen Säuregrad von nur 3—4° gewählt, um die Bildung des Paracaseinkoagulums bei Zimmertemperatur zu vermeiden. Zu jeder Probe wurden 25 ccm Casein-Kalk-

lösung genommen und unmittelbar vor der Bestimmung des Säuregrades noch 1 ccm Formalin hinzugefügt.

Versuche Nr.	Proben Nr.	Säuregrad der Casein-Kalklösung	Labferment	Zeitintervall der Wirkungsdauer des Labfermentes	Säuregrad
83	1	4,0	—	20 Minuten	13,5
83	2	4,0	1,0	20 „	13,0
83	3	4,0	1,0	40 „	12,0
83	4	4,0	1,0	60 „	12,5
84	5	3,0	—	20 „	13,0
84	6	3,0	1,0	20 „	12,0
84	7	3,0	1,0	40 „	11,0
84	8	3,0	1,0	60 „	11,0
85	9	3,0	—	20 „	12,5
85	10	3,0	1,0	20 „	11,5
85	11	3,0	1,0	40 „	11,0
85	12	3,0	1,0	60 „	11,0
86	13	3,0	-	20 „	12,2
86	14	3,0	1,0	20 „	11,0
86	15	3,0	1,0	40 „	11,0
86	16	3,0	1,0	60 „	11,0
87	17	3,0	—	30 „	13,0
87	18	3,0	1,0	30 „	12,0
87	19	3,0	1,0	1 Stunde	11,0
87	20	3,0	1,0	3 Stunden	11,0

Die Wirkung des Labfermentes in Caseinlösungen zeigt eine geringe Abnahme des Säuregrades, ca. 1—2° (auf 100 ccm Lösung bezogen). Das Zeitintervall der Wirkungsdauer des Labfermentes ruft keine gesetzmäßige Änderung der Größen hervor.

Versuche Nr. 88, 89 und 90.

Zu diesen Versuchen wurden 25 ccm Caseinlösung genommen; hinzugefügt wurden à 2 ccm oxalsaures Ammonium und 1 ccm Formalin. Der Säuregrad der Lösung war 7°.

Versuche Nr.	Proben Nr.	Labferment ccm	Zeitintervall der Wirkungsdauer des Labfermentes	Säuregrad
88	1	—	—	56,0
88	2	1,0	20 Minuten	55,0
88	3	1,0	40 „	55
88	4	1,0	60 „	54
89	5	—	— „	56
89	6	1,0	20 „	55
89	7	1,0	40 „	54
89	8	1,0	60 „	54
90	9	—	— „	56
90	10	1,0	20 „	55
90	11	1,0	40 „	55
90	12	1,0	60 „	54

Das zur Lösung hinzugefügte oxalsaure Ammonium ändert kaum das Bild der Wirkungsweise des Labfermentes — der Säuregrad der Proben wird nicht erhöht, sondern um ein geringes kleiner, wobei die Abnahme des Säuregrades bezogen auf das Zeitintervall der Wirkungsdauer des Labfermentes ganz gering ansteigt.

Alle Versuche mit Milch und Caseinlösungen bei Behandlung derselben mit Labferment geben keinen Hinweis auf die Peptonisation des Caseins, aber sprechen mehr für eine einfache Spaltung des Aggregatzustandes der Eiweißpartikel in eine Anzahl kleinerer Aggregate derselben Partikel.

Die in der Lösung zunehmende Zahl der Partikel — die Änderung des Dispersionsgrades zieht den teilweisen Übergang des Eiweißes in den Gelzustand nach sich.

Als indirekter Beweis des erörterten Phänomens möge die sich gleichbleibende elektrische Leitfähigkeit geimpfter Milch dienen.

Versuch Nr. 62.

	Zeitintervall der Wirkungsdauer	Elektrische Leitfähigkeit	Anmerkung:
Geimpfte Milch	—	$44{,}81 \cdot 10^{-4}$	Flüssigkeit
,, ,,	10 Minuten	$45{,}05 \cdot 10^{-4}$	,,
,, ,,	20 ,,	$45{,}10 \cdot 10^{-4}$	Beginn der Koagulation
,, ,,	30 ,,	$45{,}22 \cdot 10^{-4}$	volle Koagulation; Koagulationsschicht unter den Elektroden
,, ,,	45 ,,	$44{,}82 \cdot 10^{-4}$	durch Rühren ist das Koagulum zerkleinert

Die elektrische Leitfähigkeit geimpfter Milch nach Zerreibung des Koagulums unterscheidet sich nicht von eben nur geimpfter Milch.

Zum Schluß kann ich nicht umhin, zu bemerken, daß meine Mitarbeiterin Fräulein *Berdennikow* an der Ausführung des technischen Teiles der Arbeit regen Anteil genommen hat.

Schlußwort.

1. Das Labferment in Eiweißlösungen ruft nicht chemische Wirkungen hervor, sondern physikalische — Spaltung des Aggregatzustandes eiweißhaltiger Stoffe.

2. Die Bildung von Paracasein ist ein rein physikalisches Phänomen; der sich bildende Eiweißniederschlag entsteht dank der Änderung des Dispersionsgrades in der Lösung unter der Einwirkung des Fermentes im Beisein von zweivalenten Metallen und Wasserstoffionen.

Literatur.

[1]) Ch. C. **4** (II), 309. — [2]) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 170. — [3]) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **145**, 30. — [4]) Skandinav. Arch. f. Physiol. **25**, 105. — [5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 139. — [6]) *Ascher-Spiro* Bd. **2** (I), S. 193. — [7]) Malys Jahrb. **2**. 1876. — [8]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**, 177. — [9]) Inaug. Diss. Straßburg. — [10]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **7**, 220; **9**, 273. — [11]) Studies from the Yale Univers. **2**, 156. — [12]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **56**, 558. — [13]) Arch. f. Anat. u. Physiol. Suppl. **313**. — [14]) Ergebn. d. Physiol., Abt. I, **2**, 232. — [15]) Inaug. Diss. Basel. — [16]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **121**, 534. — [17]) Journ. of biol. chem. **14**, 203. — [18]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 139. — [19]) Biochem. Journ. **8**, Nr. 1. — [20]) Journ. of biol. chem. **14**, 203. — [21]) Ber. d. milchwirtsch. Inst. zu Wologda **2**, H. 1. — [22]) Biochem. Journ. **8**, Nr. 1. — [23]) Ber. d. milchwirtsch. Inst. zu Wologda **2**, H. 2. — [24]) Biochem. Journ. **9**, Nr. 2.

Neue Apparate zur Analyse des Kohlensäuregehalts der Luft.

Von

Henrik Lundegårdh.

(Mitteilungen aus der ökologischen Station auf Hallands Väderö Nr. 7.)

(Eingegangen am 13. April 1922.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Schwankungen der Kohlensäurekonzentration in der Luft sind wichtig für das Studium verschiedener biologischer Vorgänge, namentlich der Kohlensäureassimilation der grünen Pflanzen und der Atmung der Tiere. Auch die bisher in physikalischer Hinsicht wenig untersuchte Frage der Verteilung und der Bewegung der Kohlensäure in den unteren Schichten der Atmosphäre verlangt eine eingehende Kenntnis der lokalen Schwankungen in der Kohlensäurekonzentration. Ich bin seit einigen Jahren mit einer Untersuchung über die in der Umgebung der assimilierenden Blätter auf dem natürlichen Standort herrschenden CO_2-Konzentration beschäftigt und habe zu diesem Zweck zwei Apparate konstruiert, die sehr genaue Analysen gestatten. Die Apparate sind wegen ihrer unempfindlichen Konstruktion auch für Feldarbeit geeignet.

Die sehr niedrige CO_2-Konzentration der Luft stellt bekanntlich sehr große Anforderungen an die Methodik, wenn man kleine Schwankungen bestimmen will. Die nach *Petterssons* Prinzip gebauten Apparate[1]) gestatten eine Genauigkeit von $\pm$ 2,1% bis $\pm$ 2,9, auf die Kohlensäure der Luft bezogen, was für die meisten Zwecke ausreicht. Hierbei muß aber der Apparat in einem Laboratorium bei ziemlich konstanter Temperatur aufgestellt sein, und die Luftproben muß man folglich zuerst in besonderen Röhren auffangen. Wenn nicht diese Röhren peinlichst sauber und trocken sind und absolut dichte Hähne besitzen, so treten ziemlich große Fehler auf.

---

[1]) *P. Pettersson*, Zeitschr. f. analyt. Chemie **25**, S. 467. 1896; *Tigerstedt* und *Sondén*, Skand. Arch. f. Physiol. **6**, S. 16; *Palmquist*, Bih. Kungl. Svenska Vet. Akad. Handl. **18**, II., Nr. 2; *Haldane*, Journ. of Hygiene **6**, S. 74. 1906; *A. Krogh*, Danske Vid. Selsk. Math.-nat. Kl. 1919.

Die von *Pettenkofer* eingeführte Flaschenmethode wurde von *Letts* und *Blake*[1]) zu einem gleich hohen Grad von Exaktheit gebracht wie die *Pettersson*-Methode. Die genannten Autoren benutzten inwendig paraffinierte Flaschen von etwa 2 Liter Volumen und titrierten im Vakuum. Die Flasche wurde durch Hindurchsaugen von etwa 40 Liter Luft mit der Probe angefüllt. In einer Reihe von 23 Doppelproben variierte der Fehler, mit zwei Ausnahmen (wo der Fehler größer war), zwischen 0,4% und 3,2%, auf Volumen Kohlensäure bezogen. Ein Nachteil der Flaschenmethode ist die umständliche Probenaufnahme, die auch nur Durchschnittsproben aus einer größeren Luftmenge gestattet. Ich habe die *Pettenkofer*-Methode auf folgende Weise modifiziert.

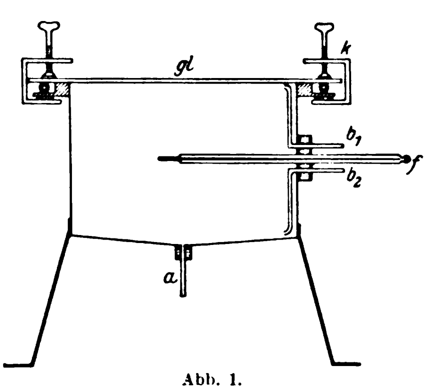


Abb. 1.

Ich benutze statt der „Flasche" ein offenes Zinkgefäß von folgendem Aussehen (vgl. Abb. 1). Das Gefäß hat die Form von einem weiten Becher (Diameter 15 cm, Höhe 16 cm), der auf drei Füßen steht. Der Rand besteht aus einem massiven Metallring mit L-förmigem Querschnitt. Der Ring ist oben fein geschliffen. Vermittels Klemmschrauben (k_1, k_2) wird die Spiegelglasscheibe *gl* luftdicht gegen den mit etwas Vaseline bestrichenen Rand gepreßt. Schon dieser Verschluß widersteht geringen Druckverschiedenheiten zwischen der eingeschlossenen Luft und der Außenluft. Damit das Gefäß auch größere Druckschwankungen (z. B. bei beträchtlichen Temperaturdifferenzen) aushalte, wird um den Ring ein mit Vaseline geschmierter Schlauch gelegt.

Seitlich befindet sich ein weiter Tubus mit einem Pfropfen, durch den ein Thermometer (*f*) und zwei Zuleitungsröhren (b_1 und b_2) hineinragen. Der Boden des Gefäßes ist schwach trichterförmig vertieft und besitzt in der Mitte das Ausflußrohr *a*.

Die Probenaufnahme geschieht am einfachsten in der Weise, daß man den Spiegelglasdeckel entfernt. Wird das Gefäß sich selbst überlassen, so wird die eingeschlossene Luft bald durch die umgebende Luft ersetzt. Beim Wiederaufsetzen des Deckels muß man natürlich den Atem halten. Wünscht man nur eine Durchschnittsprobe aus einer größeren Luftmenge, so wird das Anfüllen in wenigen Sekunden durch heftiges Umschwenken des Apparates erreicht.

[1]) *Letts* and *Blake*, Scientif. Proc. Roy. Dublin Soc. Nr. 5, **9**, S. 107. 1899—1902.

Ich habe den Apparat mit Vorteil bei täglichen Analysen der „freien“ Luft benutzt. Ferner bei Analysen von Luft in Zimmern, Gewächshäusern usw. Auch die Luft in einer bestimmten Luftschicht wird aufgefangen, wenn man den Apparat an der betr. Stelle für einige Zeit hinlegt und dann vorsichtig den Deckel aufsetzt. Zieht man für gewisse Zwecke das Saugen vor, so wird bei festgeschraubtem Deckel die Saugpumpe bei b_1 und die Zuleitungsröhre bei b_2 angeschlossen. Die Öffnungen b_1, b_2 und a werden nach dem Anfüllen mittels Glasstöpseln verschlossen.

Das Gefäß ist inwendig sorgfältig mit Paraffin überzogen. Dies um die Absorption der Kohlensäure an die Wände zu verhindern.

Die Barytlösung wird aus einer Pipette mit fast capillarer Meßröhre durch b_2 eingefüllt. Die Flüssigkeit (etwa 30 ccm) bildet auf dem schwach vertieften Boden eine große Absorptionsfläche. Nach der Absorption, die je nach der Konzentration der Barytlösung in 1—4 Stunden zu Ende ist, wird die Flüssigkeit durch a entleert. Man wäscht mit etwa 30 ccm neutralisiertem *Aqua dest.* nach. Einmaliges Auswaschen genügt vollkommen. Die Flüssigkeit wird direkt in einen kleinen 100 ccm-Kolben mit zwei Ansatzröhren aufgenommen. Die eine Röhre wird mit a verbunden, durch die andere entweicht die Luft. Die im Kolben befindliche Luft soll vorher durch Saugen durch eine Natronkalkröhre kohlensäurefrei gemacht werden. Das Titrieren erfolgt direkt in dem Kolben, der mittels eines über die Ausflußröhre geschobenen Kautschukstöpsels mit der Bürette fest verbunden wird.

Wo es sich um die Analyse kleiner Luftmengen handelt oder Luftbewegung bei der Probenaufnahme störend wirken sollte, leistet ein nach Gasglockentypus gebauter Apparat (Abb. 2) vorzügliche Dienste. In diesen Apparat wird nur soviel Luft eingesogen, als zur Analyse nötig ist.

Der Apparat besteht aus einem Zylindermantel aus Zink, der mit einer geeigneten Sperrflüssigkeit gefüllt ist. In dem Hohlraum ist eine Glocke (*gl*) aus Zinkblech beweglich aufgehängt. Die freie Oberfläche der Sperrflüssigkeit ist sehr klein: Der Abstand zwischen der Glockenwand und der inneren Wand des Hohlzylinders beträgt 5 mm. Glycerin ist als Sperrflüssigkeit sehr geeignet, weil sein Lösungsvermögen für CO_2 außerordentlich gering ist. Auch reines Paraffinöl wird mit Vorteil benutzt, doch löst diese Flüssigkeit gewisse Mengen CO_2. Aus der normalen Atmosphäre habe ich jedoch kein Aufnehmen von CO_2 in Paraffinöl analytisch nachweisen können.

Die Zinkglocke hat einen abnehmbaren Deckel aus Spiegelglas (*gl*), so daß man in das Innere schauen und auch nach Bedarf die Schale (*sch*) reinigen kann. Alle Metallteile, die mit der Luftprobe in Berührung kommen, sind mit Paraffin überzogen.

In die Barytschale (*sch*) münden zwei Glasröhren (*l* und *b*); durch die eine (*l*) wird die Luftprobe zugeleitet, durch die andere (*b*) wird Barytlösung und Waschwasser eingegossen. Der Abfluß erfolgt durch die Röhre *a*.

Die Glocke wird durch die Säulen *pp* gesteuert. Die Nullage ist durch die Metallringe p_1 p_1 bestimmt, das Volumen der Probe kann durch Einstellen der Ringe *p p* auf einer Skala beliebig verändert werden. In der Nullage bleibt selbstverständlich eine kleine Luftmenge in der Schale und über der Sperrflüssigkeit zurück. Vor der *ersten* Analyse muß dieser Raum von CO_2 befreit werden. Der Gang der Analyse ist wie folgt:

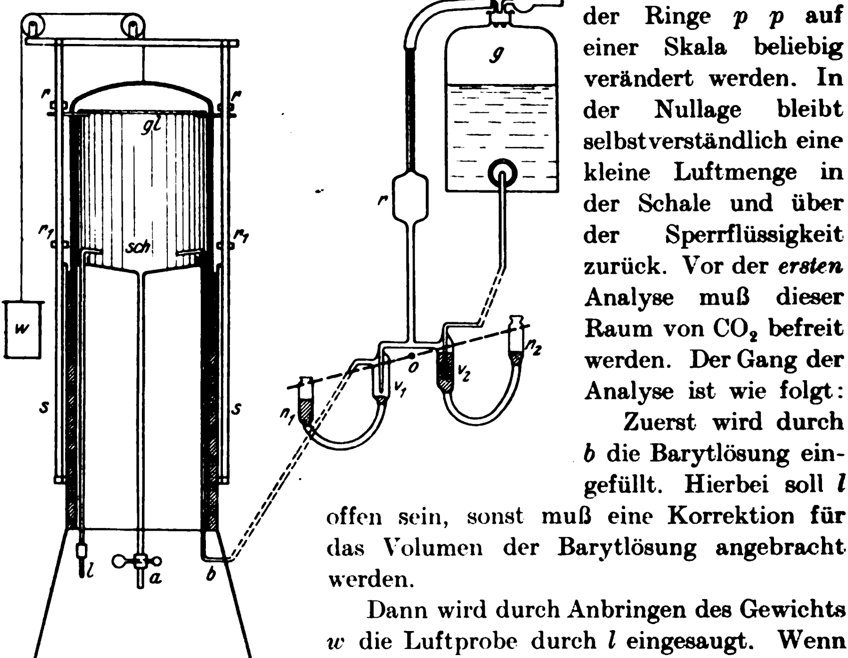


Abb. 2.

Zuerst wird durch *b* die Barytlösung eingefüllt. Hierbei soll *l* offen sein, sonst muß eine Korrektion für das Volumen der Barytlösung angebracht werden.

Dann wird durch Anbringen des Gewichts *w* die Luftprobe durch *l* eingesaugt. Wenn die Stoppringe *p p* erreicht sind, soll man einige Minuten warten, ehe *l* verschlossen wird, damit der Druck in *gl* auf Atmosphärenhöhe kommt. Wird die Probe einem geschlossenen Behälter entnommen (vgl. unten), so soll ein offener Manometer in die Leitung eingeschaltet werden.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, streicht die aus *l* eintretende Luft dicht über die Barytlösung hinweg, wodurch die Absorption beschleunigt wird. Nach dem Verschluß von *l* wird das Gewicht *w* an dem Haken aufgehängt. Die Schwere der Glocke versetzt die eingeschlossene Luft unter gelindem Druck. Hierdurch entgeht man die Gefahr, daß bei etwaiger Druckverminderung in der Glocke (z. B. bei Temperatursenkung) die Sperrflüssigkeit in die Schale *sch* hinaufsteigt.

Nach einigen Stunden wird die Barytlösung durch *a* in den oben beschriebenen Kolben entleert. Waschwasser wird durch *b* einge-

gossen und nachher in den Kolben aufgefangen, worauf man den Inhalt mit Phenolphthalein und HCl titriert.

Die Entleerung der Glocke erfolgt durch *l* oder *a*.

Ich habe mit diesem Glockenapparat eine große Zahl von Luftanalysen aus Getreidefeldern und am Waldboden gemacht. Hierbei war der Apparat auf dem Feld plaziert. Die Zuleitung der Luft fand durch dünne Glasröhren statt. Der Apparat war durch ein Holzhäuschen geschützt. — Man kann selbstverständlich auch den Apparat selbst im Laboratorium aufstellen und die Proben in portative Glockenapparate von einfacherer Konstruktion aufnehmen.

Daß mit der Barytmethode eine mindestens gleich große Genauigkeit erreicht werden kann, wie mit dem *Pettersson*-Apparat, wurde oben bei Besprechung der Methode von *Letts* und *Blake* gezeigt. Ich habe mit meinen jetzt beschriebenen Apparaten eine Reihe von Kontrollversuchen gemacht. Mit dem Becherapparat waren die Versuche so angeordnet, daß zwei geöffnete Apparate nebeneinander auf den Tisch gestellt wurden. Nach einer halben Stunde wurden die Deckel aufgesetzt.

Tabelle I.

Doppelversuche mit dem Becherapparat. Volumen der Barytlösung 15 ccm, Titer desselben 17,47 ccm $^n/_{20}$-HCl. Zimmerluft.

Nr.	Apparat A (3000 ccm)		Apparat B (3000 ccm)		Unterschied A—B	
	Titer	CO_2 pro Liter mg	Titer	CO_2 pro Liter mg	absolut mg	prozentual %
1	15,99	0,543	16,00	0,539	+0,004	+0,7
2	15,99	0,543	15,95	0,557	−0,017	−3,1
3	16,07	0,513	16,09	0,506	+0,007	+1,4
4	14,90	0,942	14,82	0,972	−0,030	−3,2
5	15,85	0,594	15,87	0,587	+0,007	+1,2
6	15,50	0,722	15,42	0,752	−0,030	−4,1
7	15,10	1,008	15,11	1,005	+0,003	+0,3
8	14,89	1,085	14,92	1,074	+0,011	+1,1

Die Methode der Probenaufnahme sichert natürlich keine völlige Gleichheit der beiden Proben. In Vers. 4 und 6, wo der Fehler am größten ist, wurde CO_2 aus einer Stahlflasche etwa $^1/_2$ Stunde vor dem Versuch hinzugeführt. Der Fehler ist in den meisten Versuchen klein und bewegt sich in derselben Größenordnung wie bei der *Pettersson*-Methode. Die benutzte Barytlösung war ziemlich stark. Desgleichen die Titrierflüssigkeit, die Fehler dürften deshalb größtenteils als Pipettierungs- und Titrierungsfehler zu rubrizieren sein. Eine größere Genauigkeit bei der Ablesung einer in $^1/_{10}$ ccm geteilten Bürette als $\pm$ 0,02 ccm dürfte nicht erreichbar sein. Dies macht bei der benutzten Konzentration

der Titrierungsflüssigkeit einen konstanten Fehler von ± 0,007 mg CO_2. Ein Blick auf die Tabelle zeigt, daß der gefundene Fehler häufig nicht größer ist.

Mit dem Glockenapparat habe ich auch Versuche mit sehr verdünnter Barytlösung gemacht (Tab. III). Die Luft wurde in die beiden Apparate gleichzeitig aus derselben Leitung gesogen.

Tabelle II.

Parallelversuche mit dem Glockenapparat. Volumen der Barytlösung etwa 30 ccm. Titer 16,02—18,40 ccm. $^n/_{20}$ HCl.

Nr.	Apparat A (2317 ccm)		Apparat B (2291 ccm)		Unterschied A—B	
	Titer	CO_2 pro Liter mg	Titer	CO_2 pro Liter mg	absolut mg	prozentual %
1	14,46	1,025	14,47	1,032	−0,007	−0,7
2	14,35	1,077	14,37	1,080	−0,003	−0,3
3	16,44	0,930	16,50	0,912	+0,018	+1,9
4	16,47	0,917	16,51	0,907	+0,009	+1,0
5	16,56	0,873	16,57	0,878	−0,005	−0,6
6	16,74	0,788	16,70	0,799	−0,011	−1,4
7	17,20	0,567	17,21	0,571	−0,004	−0,7

Tabelle III.

Parallelversuche mit dem Glockenapparat. Titer der Barytlösung 18,86—18,72. $^n/_{50}$ HCl.

Nr.	Apparat A (2317 ccm)		Apparat B (2291 ccm)		Unterschied A—B	
	Titer	CO_2 pro Liter mg	Titer	CO_2 pro Liter mg	absolut mg	prozentual %
1	15,15	0,704	15,19	0,704	+0,000	0,0
2	14,81	0,769	14,81	0,778	−0,009	−1,2
3	15,34	0,668	15,30	0,684	+0,016	+2,4
4	15,34	0,642	15,39	0,640	+0,002	+0,3
5	15,67	0,579	15,70	0,580	−0,001	−0,2
6	15,91	0,521	15,86	0,549	−0,027	−5,3
7	15,42	0,626	15,48	0,622	+0,004	+0,6
8	13,70	0,953	13,78	0,949	+0,004	+0,4
9	13,75	0,944	13,76	0,952	−0,008	−0,8
10	14,39	0,822	14,38	0,833	−0,011	−1,3
11	14,09	0,879	14,08	0,891	−0,012	−1,4
12	11,30	1,409	11,32	1,421	−0,012	−0,8
13	14,30	0,836	14,30	0,845	−0,009	−1,1

Die Übereinstimmung der Werte ist durchschnittlich besser als bei dem Becherapparat. Ausgenommen Versuch 6, Tab. III, erreicht keines der gefundenen Differenzen den mittleren Fehler (2,9) der *Pettersson*-Methode. Und doch habe ich mit *zwei* Apparaten gearbeitet.

Ein Vergleich der Tab. II und III gibt keinen deutlichen Fingerzeig im Hinblick auf den etwaigen Vorteil mit verdünnten Lösungen

zu arbeiten. Es leuchtet aber ein, daß die Ablesungsfehler mit der Verdünnung der Lösungen kleiner werden müssen. Die Titrierung wird auch etwas bequemer, weil man mit ganzen Tropfen arbeiten kann.

Um ein bequemes und genaues Abmessen der Barytlösung zu ermöglichen, benutze ich, namentlich für Analysen auf dem Felde, eine halbautomatische Vorrichtung wie in Abb. 2 rechts. Der Glockenapparat ist mit einem Holzgestell verbunden, auf welches die Vorratsflasche *g* steht. Die Pipettenröhre hat eine lichte Weite von $1-1^1/_2$ mm, der Rauminhalt ist etwa 30 ccm. Das T-förmige Endstück der Pipette steht in Verbindung mit zwei Quecksilberventilen, v_1 und v_2. Die Niveaugefäße n_1 und n_2 sind auf den Armen eines Hebels *h* befestigt, der sich um *O* dreht. In der in der Abbildung angegebenen Lage des Hebels ist v_2 verschlossen und v_1 geöffnet. Die Barytlösung strömt also aus *r* in die Schale *sch*. Wird der Hebel umgestellt (also der linke Schenkel von *a—b* gehoben), so tritt Verschluß ein in v_1, während v_2 sich öffnet. Die in *g* vorhandene Barytlösung strömt folglich jetzt durch v_2 in die Pipette *r*. Wegen der capillaren Dimensionen der oberen Pipettenröhre spielen die Niveauverhältnisse in *g* eine sehr geringe Rolle. Immerhin kann man ja leicht eine Korrektur für das allmählich sinkende Niveau anbringen. Das untere Niveau nach dem Entleeren der Pipette ist konstant.

Diese Vorrichtung arbeitet sehr genau, nur muß man Vorsicht üben beim Umstellen der Hebel, damit das Quecksilber nicht in Pendelbewegungen gerät. Wenn man eine ähnliche Vorrichtung auch für Abmessen des Waschwassers benutzt, soll die Glocke noch eine Zuleitungsröhre haben.

Über Erfahrungen mit Mikroanalysen nach Bang.

I. Mitteilung.

Von

Ludwig Petschacher.

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Innsbruck.)

(Eingegangen am 13. April 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Eine Untersuchungsmethode, welche gestattet, in einigen Blutstropfen den Gehalt an Chloriden, Zucker, Stickstoff usw. zu bestimmen, bietet Vorteile, welche ich nicht zu erörtern brauche. Mit der Brauchbarkeit der *Bang*schen Mikroanalyse haben sich mehrere Autoren beschäftigt und sind hierbei zu verschiedenen Resultaten gelangt. Ein Teil schreibt denselben dieselbe Genauigkeit zu, welche mit den sonst üblichen Methoden zu erreichen ist, andere lehnen sie ab, andere hingegen schlagen Abänderungen vor. *Bang* selbst hat gewisse Mängel seiner Methoden gefühlt und bis an sein Lebensende an der Verbesserung derselben gearbeitet, um seine geniale Idee der Verwirklichung zuzuführen. Diese Umstände veranlaßten mich, die Genauigkeit der Mikromethoden *Bangs* zu untersuchen. Auf die Verschiedenheit der Zusammensetzung des Blutes in den Capillaren und den Venen einerseits, sowie in einer größeren Blutmenge und in einigen Tropfen andererseits, soll hier nicht eingegangen werden.

Im folgenden sollen die Erfahrungen wiedergegeben werden, welche ich hierbei gemacht habe.

I. Kochsalzbestimmung.

Die Bestimmung der Chloride ist nach *Bangs* eigenen Worten die einfachste von den Mikrobestimmungen. Die $^{n}/_{100}$-$AgNO_3$-Lösung wird aus einer $^{n}/_{10}$-Lösung bereitet. Der Titer wird gegen $^{n}/_{10}$-NaCl-Lösung von bekanntem Titer nach *Volhard* bestimmt und von Zeit zu Zeit kontrolliert. Die Erkennung des Farbenumschlages erfordert trotz des Vorteiles, den die Unlöslichkeit des Kaliumchromats in Alkohol bietet, eine gewisse Übung. Es ist am besten sich im Anfange Mischungen zu machen, welche den Umschlag der Farbe von Grüngelb in Gelbbraun

vor Augen führen und sich bei den Titrationen danach zu richten. Als Methode für Paralleluntersuchungen verwendete ich folgende: ca. 10 g Blut wurden in eine vorher gewogene Nickelschale gebracht und nach neuerlicher Wägung mit 1 g chemisch reinem Natriumcarbonat eingedampft, dann über offener Flamme vorsichtig getrocknet und dann langsam erst über dem Bunsenbrenner, später am Luftgebläse verascht; es muß sodann solange geglüht werden, bis sich eine reine weiße Schmelze gebildet hat. Nach dem Erkalten wird in wenig Wasser gelöst, in einen 100 ccm Meßkolben gespült, mit Salpetersäure angesäuert und das Kochsalz nach *Volhard* titrimetrisch bestimmt. Die Ergebnisse der Parallelbestimmungen im Venenblute gibt folgende Tabelle:

Tabelle I.

Makromethode %	Mikromethode %
0,562	0,581
0,527	0,561
0,512	0,532
0,605	0,619
0,493	0,518
0,567	0,589
0,537	0,556
0,407	0,428
0,456	0,471
0,451	0,482

Wir ersehen aus dieser Tabelle, daß die Mikrobestimmung des Kochsalzes für die größte Mehrzahl von klinischen Untersuchungen genügend genau ist. Der Fehler der Methode bei Verwendung von Kochsalzlösungen in 92proz. Alkohol, deren Zusammensetzung man vorher bestimmt hat, beträgt, wie ich feststellen konnte, $\pm$0,01 mg. Bei den Parallelbestimmungen im Venenblute beträgt die Differenz 0,014 bis 0,035%. Die Werte sind also im allgemeinen um rund 0,02 höher als bei der Makromethode. Dies ist in erster Linie wohl auf den Umstand zurückzuführen, daß die Enteiweißung mit 92proz. Alkohol keine vollständige ist und daß ein Teil der verbrauchten $^n/_{100}$-$AgNO_3$-Lösung dem nicht ausgefällten Eiweiß entspricht. Wegen der großen Einfachheit der Methode wird uns dieselbe auch bei Kochsalzbestimmungen im Urin gute Dienste leisten können.

II. Bestimmung des Blutzuckers.

Große Mühe und Sorgfalt hat *Bang* auf die Ausarbeitung dieser Methode verwendet. Ich untersuchte die Brauchbarkeit der beiden letzten Modifikationen, welche *Bang* angegeben hat, und hielt mich genau an die von ihm gegebenen Vorschriften. Die von *Bang* festgestellte Menge $^n/_{100}$-Jodlösung, welche 1 mg Glucose entsprechen soll,

(F = 2,8) wird von einigen Autoren anders angegeben. Die 2 Hauptschwierigkeiten, welche bei der Ausarbeitung der Methode überwunden werden mußten, bestehen nach *Bangs* eigenen Angaben in der Luftoxydation und der Intensität des Kochens bei der Reduktion. Beide Übelstände glaubte *Bang* durch Einführung der indirekten Titration einerseits[2]) [3]) durch Erhitzung mit Wasserdampf durch genau 4 Minuten andererseits[4]) ausgeschaltet zu haben. Für die ursprüngliche Methode der direkten Titration mit $^{n}/_{200}$-Jodlösung empfahl *Ege*[5]) eine gesamte Erwärmungsdauer von 7 Minuten (statt $1^{1}/_{2}$ Minuten bis zum Beginne des Kochens und 2 Minuten Kochzeit nach *Bang*). Als Grund hierfür gibt er an, daß erst nach dieser Zeit die Werte für verbrauchte $^{n}/_{200}$-Jodlösung konstant proportional der verwendeten Glucosemenge sind. Es entspricht dann 1 ccm $^{n}/_{200}$-Jodlösung 0,160 mg Glucose, d. h. 1 mg Glucose entspricht 3,1 ccm $^{n}/_{100}$-Jodlösung (F = 3,1). Derselbe Autor fand, daß die Werte, welche 1 ccm $^{n}/_{200}$-Jodlösung entsprechen, bei verschiedener Erwärmungszeit ziemlich erheblich differieren. Um diesem Übelstand abzuhelfen, empfahl *Bang* die Erhitzung mit Wasserdampf. Hierdurch wird die Salzkonzentration und damit auch der Siedepunkt der Lösung konstant erhalten. Länger als 4 Minuten zu erhitzen sei nicht nötig.

Oppler[6]) fand, daß F für Zuckermengen unter 0,5 mg viel niedriger als 2,8 ist. Für 0,027 mg beträgt er nur 0,84 und steigt mit der Menge der verwendeten Glucose an bis er bei 0,5 mg Glucose ungefähr 2,8 beträgt. In anderen Versuchsreihen erreichte er jedoch geringere Werte und zwar als Minimum für 0,5 mg Glucose 1,2. Er hält eine Kochzeit von $4^{1}/_{2}$ Minuten für nötig. *Tervaert*[7]) erhält in einer Versuchsreihe für F Werte zwischen 2,00 und 2,37, im Durchschnitte 2,22. Bei Verwendung dieses Faktors ergeben sich jedoch ganz erhebliche Differenzen zwischen berechnetem und gefundenem Glucosewert bis zu 0,1 mg. Auch fand er, daß die Erhitzungszeit und -intensität nicht gleichgültig sei. *Richter-Quittner*[8]) wendet sich in erster Linie gegen die Enteiweißungsmethode und gegen die Verwendung so geringer Blutmengen. Sie, *Pearce*[9]) u. a. empfehlen mindestens 3 ccm Blut für die Analyse zu verwenden. *Mertz*[10]), der mit der vorletzten Modifikation nach *Bang* mit alkalischer Jodatlösung arbeitet, erhält genaue Resultate. Er erhitzt 5 Minuten lang und gibt an, daß es auf eine halbe Minute mehr oder weniger, sowie auf Schwankungen der Kochintensität nicht ankomme. *Feigl*[11]) und *Pincussen*[12]) loben die Genauigkeit der Methode.

Ich verwendete bei meinen Untersuchungen sowohl die saure als auch die alkalische Jodatlösung. Zur Untersuchung kamen Traubenzuckerlösungen verschiedener Konzentration. Dieselben wurden mit frisch destilliertem Wasser hergestellt, die Lösung aufgekocht und steril aufbewahrt. Der Zuckergehalt der Lösung wurde teils polarimetrisch, teils nach *Bertrand* bestimmt. Der Titer der $^{n}/_{200}$-Thiosulfatlösung wurde durch Titration gegen eine aus $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure, Kaliumjodid und Kaliumjodat frisch bereitete $^{n}/_{100}$-Jodlösung bestimmt und öfter kontrolliert. Die Thiosulfatlösung veränderte ihren Titer im Laufe von 2—3 Wochen ein wenig. Alle Lösungen wurden genau nach *Bangs*

Vorschriften aus reinsten Präparaten von Merck und frisch destilliertem Wasser hergestellt. Bei allen Versuchsreihen hielt ich die gleichen Bedingungen ein. Alle Versuche wurden zur gleichen Tageszeit, zu welcher der gleiche Gasdruck von 40 mm herrschte, angestellt. Die Flammenhöhe war stets die gleiche und zwar derartig, daß die Flüssigkeitsmenge sich während der Reduktion möglichst wenig veränderte. Bei allen Proben verwendete ich die gleichen Mengen Reagentien, die Meßgefäße waren immer dieselben und es wurden nur Gefäße aus Jenaer Glas angewendet. Auch die zeitliche Einteilung wurde bei allen Proben streng eingehalten. Nach jeder Analyse wurde das Wasser im Verdampfungskolben auf die gleiche Menge ergänzt.

Aus der großen Reihe von Versuchen seien die folgenden wiedergegeben:

Tabelle II.

Zusatz von saurer Jodatlösung, Titration mit $^{n}/_{200}$-Thiosulfat (log Tit. 72 420), $4^{1}/_{2}$ Minuten Erhitzungszeit, Blindwert 3,56 ccm Thiosulfat.

Nr.	I. Berechnete Glucose mg	II. $^{n}/_{200}$-Thiosulfat ccm	III. $^{n}/_{100}$-Jod entsprechend ccm	IV. F daraus berechnet	V. Mit Benützung d. Durchschnittes von F gefunden
1	0,023	3,47	0,05	2,18	0,025
2	0,046	3,45	0,06	1,30	0,030
3	0,070	3,36	0,10	1,43	0,051
4	0,093	3,26	0,16	1,72	0,081
5	0,116	3,16	0,21	1,81	0,106
6	0,174	2,92	0,34	1,95	0,172
7	0,232	2,72	0,45	1,94	0,227
8	0,290	2,46	0,58	2,00	0,292
9	0,348	2,24	0,70	2,01	0,354
10	0,406	2,00	0,83	2,04	0,419
11	0,464	1,76	0,95	2,05	0,479
12	0,580	1,32	1,19	2,05	0,601
	Durchschnitt von F für 5—12:			1,98	

Tabelle III.

Einen Tag später unter gleichen Bedingungen. Blindwert 3,56 ccm Thiosulfat.

Nr.	I. Berechnete Glucose mg	II. $^{n}/_{200}$-Thiosulfat ccm	III. $^{n}/_{100}$-Jod entsprechend ccm	IV. F daraus berechnet	V. Mit Benützung d. Durchschnittes von F gefunden
1	0,048	3,40	0,08	1,66	0,038
2	0,105	3,18	0,20	1,90	0,096
3	0,162	2,88	0,36	2,22	0,173
4	0,215	2,72	0,45	2.09	0,216
5	0,264	2,48	0,57	2,16	0,274
6	0,345	2,26	0.69	2,00	0,331
7	0,472	1,70	0,99	2,09	0,476
	Durchschnitt von F:			2,08	

Tabelle IV.

Zusatz von alkalischer Jodatlösung, Titration mit $^n/_{200}$-Thiosulfatlösung (log Tit. 72 420), $4^1/_2$ Minuten Erhitzungszeit, Blindwert 3,64 Thiosulfat.

Nr.	I. Berechnete Glucose mg	II. $^n/_{200}$-Thiosulfat ccm	III. $^n/_{100}$-Jod entsprechend ccm	IV. F daraus berechnet	V. Mit Benützung d. Durchschnittes von F gefunden
1	0,023	3,50	0,07	3,14	0,036
2	0,046	3,40	0,13	2,83	0,066
3	0,070	3,36	0,15	2,14	0,076
4	0,093	3,34	0,16	1,72	0,082
5	0,116	3,20	0,23	1,98	0,117
6	0,174	2,98	0,35	2,00	0,178
7	0,232	2,83	0,43	1,85	0,219
8	0,290	2,55	0,58	2,00	0,296
9	0,348	2,40	0,66	1,99	0,332
10	0,406	2,13	0,80	1,97	0,408
11	0,464	1,90	0,92	1,98	0,469
12	0,522	1,68	1,04	2,00	0,530
13	0,580	1,45	2,19	2,00	0,592
		Durchschnitt von F für 5—13:		1,96	
		2 Tage später Durchschnitt von F:		1,74	

Aus Tabellen II—IV ist ersichtlich, daß sowohl bei Verwendung der sauren als auch der alkalischen Jodatlösung der Faktor F nicht unbeträchtliche Schwankungen zeigt. Nimmt man den Durchschnittswert von F für Glucosemengen über 0,100 mg und berechnet mit Hilfe dieses Faktors die Glucose, so ergeben sich nicht unbeträchtliche Fehler. In verschiedenen Versuchsreihen schwankte der Durchschnittswert zwischen 1,74—2,23. Es war naheliegend, die Ursache dieses Phänomens in der Erhitzungsdauer zu suchen. Das Resultat einer Untersuchung dieser Frage bringt folgende Tabelle:

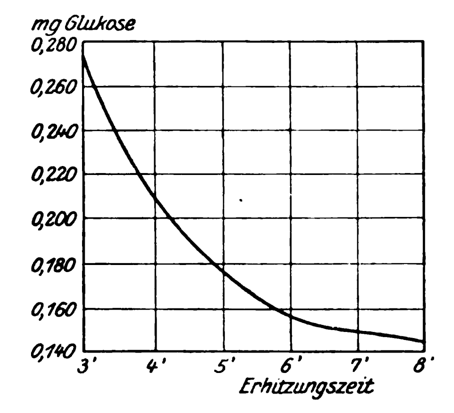
Tabelle V.

Alkalische Jodatlösung, Titration mit $^n/_{200}$-Thiosulfat (log Tit. 72 677), verwendete Glucosemenge 0,348 mg.

Erhitzungszeit	Blindwert	ccm $^n/_{200}$-Thiosulfat	ccm $^n/_{100}$-J entsprechend	F	1 ccm $^n/_{200}$-J = Glucose mg
3 Min.	3,82	2,62	0,64	1,83	0,273
4 „	3,81	2,24	0,84	2,41	0,208
5 „	3,80	1,96	0,98	2,81	0,177
6 „	3,80	1,73	1,10	3,16	0,158
7 „	3,79	1,61	1,16	3,33	0,150
8 „	3,78	1,49	1,22	3,50	0,143

Ganz ähnlich waren die Verhältnisse auch bei Verwendung von saurem Jodat. Wir ersehen daraus, daß die Erhitzungszeit nicht ohne Einfluß auf den Ablauf der Reduktion ist. Bestimmt man die Menge Glucose, welche 1 ccm $^n/_{200}$-Jodlösung entspricht und trägt in einem Koordinatensystem diese Werte als Ordinate, die Erhitzungszeit als Abscisse ein,

so erhält man nebenstehende Kurve.



Die Kurve ist einer von *Ege* gebrachten ähnlich, welche dieser bei Verwendung der alten Methode mit Kochen und direkter Titration mit $^n/_{200}$-Jodlösung erhielt. Ebenso wie dort läßt sich auch hier an der Kurve ableiten, daß mit der Kochzeit die Genauigkeit zunehmen müsse. Ich untersuchte daher die Methode in dieser Richtung. Das Ergebnis bringen die folgenden beiden Tabellen.

Tabelle VI. Zusatz von saurer Jodatlösung, Titration mit $^n/_{200}$-Thiosulfat (log Tit. 72 262), Blindwert 3,88 ccm Thiosulfat, 8 Minuten Erhitzungszeit.

Nr.	I. Berechnete Glucose mg	II. $^n/_{200}$-Thiosulfat ccm	III. $^n/_{100}$-Jod entsprechend ccm	IV. F daraus berechnet	V. Mit Benützung d. Durchschnittes von F gefunden
1	0,023	3,61	0,09	3,91	0,025
2	0,046	3,48	0,21	4,56	0,060
3	0,070	3,37	0,27	3,88	0,077
4	0,093	3,29	0,31	3,33	0,088
5	0,116	3,13	0,40	3,45	0,115
6	0,232	2,27	0,85	3,66	0,243
7	0,348	1,59	1,21	3,48	0,347
8	0,464	0,79	1,63	3,51	0,467
9	0,580	0,05	2,02	3,48	0,578
	Durchschnitt von F:			3,49	
	An einem anderen Tag Durchschnittswert von F:			3,32	

Tabelle VII. Zusatz von alkalischer Jodatlösung, Titration mit $^n/_{200}$-Thiosulfat (log Tit. 72 677), Blindwert 3,82 Thiosulfat, 8 Minuten Erhitzungszeit.

Nr.	I. Berechnete Glucose mg	II. $^n/_{200}$-Thiosulfat ccm	III. $^n/_{100}$-Jod entsprechend ccm	IV. F daraus berechnet	V. Mit Benützung d. Durchschnittes von F gefunden
1	0,023	3,64	0,10	4,35	0,031
2	0,046	3,49	0,18	3,91	0,053
3	0,070	3,37	0,24	3,43	0,075
4	0,093	3,27	0,29	3,12	0,091
5	0,116	3,13	0,37	3,22	0,115
6	0,232	2,38	0,77	3,31	0,239
7	0,348	1,72	0,12	3,22	0,349
8	0,464	1,07	1,47	3,17	0,458
9	0,580	0,29	1,88	3,24	0,586
	Durchschnitt von F:			3,21	
	An einem anderen Tage F:			3,40	

Tatsächlich sind die Resultate für die Berechnung mit dem Durchschnittswerte von F hier besser geworden. Aber es zeigt sich auch hier wiederum der Übelstand, daß in verschiedenen Versuchsreihen der Wert für F ein anderer war. Er schwankte bei einer Erhitzungszeit von 8 Minuten in meinen Versuchen zwischen 3,21—3,51. Die Folgen dieses Umstandes liegen auf der Hand. Eine Ursache dafür habe ich nicht nachweisen können. Ich vermute nur, daß sich hier alle möglichen äußeren Einflüsse geltend machen, wie z. B. der Barometerstand, die Dampfspannung der Luft, die Ionisation der Luft u. a., welche bei Verwendung von größeren Zuckermengen nicht in Betracht kommen. Es ist aber aus meinen Versuchen auch ersichtlich, daß der Fehler hauptsächlich bei Werten unter 0,3 mg Glucose zum Ausdruck kommt, Werten, mit welchen wir es bei Verwendung von nur 100—150 mg Blut hauptsächlich zu tun haben.

III. Bestimmung des Reststickstoffes.

Bei der Untersuchung der Methode für die Mikroanalyse des Stickstoffes richtete ich mein Hauptaugenmerk auf die Bestimmung des Reststickstoffes. Bei der Bestimmung des Gesamtstickstoffes handelt es sich ja um Stickstoffmengen von mehr als 1 mg (wenn man 100—150 mg Blut verwendet). Solche Mengen kommen aber auch bei den üblichen Reststickstoffbestimmungen in Betracht. Bei der Reststickstoffbestimmung nach *Bang* handelt es sich jedoch um Mengen bis herab auf 0,020 mg. *Bang* selbst macht wiederholt auf die Schwierigkeiten der Methode aufmerksam. Ein Stickstoffgehalt der Lösungen, ein späteres Hinzukommen stickstoffhaltiger Substanzen insbesondere von Ammoniak aus der Umgebung soll durch alle möglichen Vorsichtsmaßregeln verhindert werden. Trotzdem fand er bei Blindversuchen noch einen Verbrauch von 0,22 ccm $^{n}/_{200}$-Thiosulfatlösung weniger als der vorgelegten Menge Jodlösung entsprechen dürfte. Das entspricht einer Stickstoffmenge von 0,015 mg. Im Laboratorium einer Klinik, wo stets organische Substanzen wie Urin, Faeces usw. zur Untersuchung bereitstehen, wird der Ammoniakgehalt der Luft großen Schwankungen unterliegen. Es ist daher notwendig, die Reststickstoffbestimmungen in einem eigenen Raum anzustellen, welcher außerhalb des allgemeinen Laboratoriums liegt. Gleichzeitig mit *jeder* Bestimmung muß eine Blindbestimmung gemacht werden.

Ich führte meine Versuche in einem Raume des Laboratoriums aus, welcher sonst nur für mikroskopische Untersuchungen benützt wird, und achtete auf möglichste Fernhaltung aller obengenannten Einflüsse. Bei Blindversuchen ergab die Berechnung 0,015—0,085 mg Stickstoff. Die Resultate, welche ich bei Untersuchung von Harnstoff- und Harnsäurelösungen von bekanntem Stickstoffgehalt erhielt, zeigten erhebliche

Differenzen zwischen berechnetem und gefundenem Werte. Ich schließe mich auf Grund dieser Untersuchungen der Meinung von *Richter-Quittner* (l. c.), welche auch niemals übereinstimmende Werte erhalten konnte, an und empfehle für diese Methode die Verwendung von Blutmengen über 2 ccm.

Zusammenfassend möchte ich sagen:

1. Die Bestimmung der Chloride mittels der Mikroanalyse von *Bang* in einigen Tropfen Blutes gibt bei guter Übung und präziser Arbeit für die Klinik hinreichend genaue Resultate.

2. Die Bestimmung des Blutzuckers ist in der gegenwärtigen Fassung nicht genau und gibt uns nur bei groben Schwankungen des Blutzuckers einen Anhaltspunkt.

3. Die Reststickstoffbestimmung ist auch für letzteren Zweck in der gegenwärtigen Form ungenau.

Literatur.

[1]) *Bang, Ivar,* Methode zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile. Wiesbaden 1916. — [2]) Derselbe, diese Zeitschr. **87**, 248. 1916. — [3]) Derselbe, diese Zeitschr. **92**, 244. 1918. — [4]) *Bang, I.* und *Hatlehoels,* diese Zeitschr. **87**, 264. 1916. — [5]) *Ege,* diese Zeitschr. **87**, 177. 1916. — [6]) *Oppler,* Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 57. 1920. — [7]) *Tervaert,* Zeitschr. f. physiol. Chem. **110**, 41. 1920. — [8]) *Richter-Quittner, M.*, diese Zeitschr. **96**, 92. 1919. — [9]) *Pearce, R. G.*, Journ. of biol. chem. **22**, 525. 1915. — [10]) *Mertz,* Zeitschr. f. physiol. Chem. **111**, 43. 1920. — [11]) *Feigl,* Zentralbl. f. klin. Med. **41**, 17. 1920. — [12]) *Pincussen,* Mikromethodik. Leipzig 1921.

Beiträge zur Kenntnis des Vitamins (B) nebst Darstellungsmethode.

Von

Sogen Tsukiye.

(Aus der Biochemischen Abteilung des Instituts für Infektionskrankheiten der Kaiserlichen Universität zu Tokio.)

(Eingegangen am 13. April 1922.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

I. Einleitung.

Über die Ursache der Polyneuritis gallinarum sind bis jetzt sehr viele Theorien aufgestellt worden; die meisten Forscher glaubten, die Schuld sei dem Verlust oder Mangel irgendeiner chemischen Substanz zuzuschreiben.

Eijkman[1]) machte im Jahre 1896 darauf aufmerksam, daß Polyneuritis gallinarum durch Eingeben der Reiskleie geheilt werden kann. *Bléadat*[2]) im Jahre 1901, *Gryns*[3]) und gleichfalls noch viele andere erkannten, daß der Extrakt der Reiskleie das beste Mittel gegen die Beriberi ist, und sie vermuteten, daß in der Reiskleie noch irgendeine unbekannte Substanz existiere, deren Mangel die Beriberi verursache. Diese wirksame Substanz wurde „water soluble B" oder „Vitamin B" von *Mac Collum* und *C. Kennedey* benannt. Um die Frage zu lösen, was diese Substanz eigentlich ist, haben die Forscher die verschiedensten Ansichten entwickelt.

Hier möchte ich zuerst einige der hauptsächlichsten Theorien folgen lassen:

1. Mangel des Eiweißes und der Salze (*C. Eijkman*).

2. Mangel von Protein, welches zum Prolamin gehört [*O. Rosenheim* und *S. Kajiura*[4]), *H. Fraser* und *A. T. Stanton*[5])].

3. Die Beziehung zu Phosphorsäure und Phosphaten wie Phytin [*H. Fraser*, *A. T. Stanton*[6]), *H. Aron*, *F. Hocson*[7])].

4. Die Beziehung zu den Phosphor- und Kaliumsalzen [*Kilbourn*[8]), *Urbeanu*[9]), *van Hoogenhuyze*[10])].

5. Nucleoproteide [*H. Schaumann*[11])].

6. Die Beziehung zu den Derivaten der Nicotinsäure wie Trigonellin oder Betain [*H. Schaumann*[12])].

7. Cholin und Lecithin.

8. Fehlen oder Mangel einer oder mehrerer Aminosäuren [*F. Roehmann*[13])].

Die meisten Forscher betrachten dieses Vitamin B als eine bis jetzt chemisch unbekannte Substanz.

Wie steht es aber mit dem chemischen Studium des Vitamin B?

Hierüber machte *Eijkman*[14]) 1906 Angaben. *Casimir Funk*[15]) setzte sodann die Untersuchung dieser Substanz seit 1910 fort, einmal glaubte er, den wirksamen Bestandteil in Krystallform erhalten zu haben, jedoch kamen ihm später Bedenken auf; denn, was er durch seine Methode zuletzt erhielt, war von so minimaler Quantität, daß die Vitaminwirkung nur schwach und kein Material für die chemische Untersuchung übrig blieb.

Man konnte nur auf Grund einiger Eigenschaften behaupten, daß diese Substanz eine neue Form von Pyrimidinderivaten sei. Später haben *Williams* und *Seidell*[16]) eine bemerkenswerte antineuritische Wirkung des Hydro-oxypurins festgestellt und schlossen daraus, daß der wirksame Bestandteil des Hefenextrakts isomer mit Adenin sein müsse. Hierauf hat *Williams*, der die Wirkung von Hydroxypyridin beobachtete, behauptet, daß der wirksame Bestandteil eine Isoform der Nicotinsäure sei. 1913 habe *Suzuki*, *Odake* und *Shimamura*[17]) den wirksamen Bestandteil der Reiskleie getrennt und isolierten es als Oryzaninpikrat, aber es ist nicht gewiß, ob diese krystallinische Substanz mit dem Vitamin B identisch ist. Im Jahre 1921 führt *S. Oseki*[18]) eine Hydrolyse des Reiskleieextraktes aus, es fällte durch Gerbsäure den wirksamen Bestandteil. Mit Silbernitrat und Baryt teilte er die Histidinfraktion und wies darin den wirksamen Bestandteil nach, aber am Schluß erhielt er als Ergebnis eine kleine Menge leicht gelblich gefärbter, harziger Substanz. Außer den obenerwähnten Forschern haben *E. B. Vedder*, *R. R. Williams*[19]), *H. Schaumann*[20]), *J. C. Drummond* und *C. Funk*[21]), *C. N. Meyers* und *Voegtlin*[22]), *N. M. Saleeby*[23]) u. a. m. Untersuchungen angestellt, jedoch blieben ihnen das Isolierungsverfahren und die chemische Natur des Vitamins B unbekannt.

Hier will ich meine eigenen chemischen Untersuchungen des Reiskleienextrakts anführen über die Frage, in welchem Zustand sich Vitamin B im Reiskleienextrakt befindet, und schließlich will ich die Isolierungsmethode mitteilen.

II. Chemische Untersuchung des Reiskleienextrakts.

Der Reiskleienextrakt wurde des öfteren in Verbindung mit dem Studium des Vitamin B untersucht, und bis jetzt sind doch seine Bestandteile mit Ausnahme eines Bruchteils unbekannt. Wie schon vorhergehend erwähnt, nimmt man an, daß Vitamin B zu den Purin- oder Pyrimidinbasen oder Aminosäure in irgendeiner Beziehung stehe. Diesen Punkten schenkte ich daher bei meiner Untersuchung des Reiskleienextrakts hauptsächlich Aufmerksamkeit.

A. Alkoholextrakt der Reiskleie.

30 kg Reiskleie, die von Sand gereinigt ist, wird durch Erwärmen mit 80—85% reinem Alkohol zwei oder dreimal extrahiert.

Hierauf drückt man das Ganze gut aus und sammelt den Alkoholextrakt. Nach Abdampfung des Alkohols läßt man den Rückstand

einige Zeit stehen und entfernt die Fettschicht. Zuerst nimmt man das Fett und Lipoid mittels Äthers auf. Es verbleibt dann eine saure Flüssigkeit von dunkelbrauner Farbe mit etwas süßlichem Geschmack. Diesem wird Bleiessig hinzugefügt, filtriert und der erhaltene Niederschlag mit Wasser ausgewaschen. Aus dem Filtrat nimmt man das Blei als Sulfid wieder heraus und kühlt es nach vollständiger Vertreibung des Schwefelwasserstoffes ab. Dann fügt man ihm zuerst zu 5% Schwefelsäure und dann so viel konzentrierte Phosphorwolframsäure zu, bis nichts mehr ausfällt, und filtriert. Den erhaltenen Niederschlag wäscht man mit 5% Schwefelsäure gut aus, und das Filtrat, welches mit (A) bezeichnet wird, wird für spätere Untersuchungen aufbewahrt.

Der Niederschlag wird mit Baryt zersetzt, unter Vermeidung des Überschusses, und filtriert. Den Niederschlag wäscht man gut aus und sammelt das Filtrat. Nun leitet man in das alkalische Filtrat kohlensäurefreie Luft hinein und beseitigt die Ammoniaksalze, die mit der Phosphorwolframsäure mit ausfallen. Nach Entfernung des Bariums macht man die Lösung mit verdünnter Salpetersäure sauer und fügt ihr Silbernitrat hinzu (Silbernitrat wird so viel hinzugefügt, bis ein klarer Tropfen aus der oberen Schicht dieser Lösung mit konzentriertem Barytwasser einen gelblich braunen Niederschlag bildet). Hierauf wäscht man den Niederschlag mit Wasser aus und bezeichnet ihn als Fraktion 1 (F. 1). Für weitere Behandlung des Filtrats neutralisiert man mit Barytwasser zurück. Beim schwach Alkalischwerden entsteht ein Niederschlag. Man prüft die Lösung nach Zusatz einer kleinen Menge Barytwasser, indem man das Absetzen des Niederschlages abwartet und von der klaren Flüssigkeit eine kleine Probe zur Prüfung mit ammoniakalischer Silberlösung entnimmt. Entsteht beim Zusammenfließen beider Flüssigkeiten ein in Überschuß des Ammoniaks leicht löslicher Niederschlag, so fügt man weiterhin eine kleine Menge Barytwasser hinzu. Den entstandenen Niederschlag wäscht man mit Wasser, welches durch Baryt ganz schwach alkalisch gemacht ist. Der Niederschlag wird mit F. 2 bezeichnet.

Wenn nun das Filtrat mit Barytpulver gesättigt wird, entsteht wiederum ein Niederschlag, den man so lange mit gesättigtem Barytwasser auswäscht, bis er auf Salpetersäure nicht mehr reagiert.

Dieser Niederschlag wird mit F. 3 bezeichnet.

Wiederum sammelt man das Filtrat und schafft Silber und Schwefelsäure heraus.

Hierauf säuert man die Lösung in 5% Verhältnis mit Schwefelsäure an und gießt konzentrierte Phosphorwolframsäure hinzu, wodurch ein Niederschlag entsteht, der mit Baryt zersetzt wird. Nach Beseitigung des Bariums hebt man ihn als F′ 4 auf.

1. Behandlung von F. 1.

Der Niederschlag wird in verdünnter Schwefelsäure gelöst und das Silber mit Schwefelwasserstoff entfernt. Macht hierauf die Lösung mit Ammoniak alkalisch und fügt ihr ammoniakalische Silberlösung hinzu, wodurch ein flockiger Niederschlag entsteht. Man wäscht ihn aus und trennt ihn nach *Krueger-Salomon*schem Verfahren[24]) in:

1. Xanthinfraktion,
2. Hypoxanthinfraktion.

Nach weiterer Behandlung erhält man aus Hypoxanthinfraktion Adenin und Hypoxanthin (s. Photographie 1, 2).

2. Behandlung von F. 2.

Der Niederschlag wird in verdünnter Schwefelsäure gelöst. Nach Beseitigung des Bleis und dann der Schwefelsäure hat man eine fast neutrale Flüssigkeit. Man säuert mit Salpetersäure schwach an, verdampft und trocknet sie langsam auf dem Wasserbad. Diese getrocknete Substanz wird mit 10% Silbernitratlösung, welche mit Salpetersäure schwach angesäuert ist, extrahiert, dabei bleibt der Farbstoff als Rückstand zurück, den man mit der gleichen Lösung von Silbernitrat auswäscht. Zu dem Filtrat tropft man vorsichtig ammoniakalische Silberlösung zu, wodurch ein flockiger Niederschlag sich bildet, der sich aber in überschüssiger ammoniakalischer Silberlösung wieder auflöst.

Den entstandenen Niederschlag wäscht man mit Wasser gut aus.

Hierauf löst man ihn in verdünnter Schwefelsäure und entfernt das Silber mit Schwefelwasserstoff. Nach Beseitigung der Schwefelsäure hat man eine gelbliche, neutrale Flüssigkeit. Diese hat, wie schon erwähnt, hinsichtlich der chemischen Eigenschaft große Ähnlichkeit mit Histidin, ist jedoch von diesem verschieden, da die Diazoreaktion negativ ausfällt, und noch in anderer Beziehung. Mit Pyrimidinbasen und Allantoin hat es ähnliche und verschiedene Eigenschaften, wie später tabellarisch verzeichnet wird.

Wie nachher berichtet wird, überzeugten mich die Experimente, die ich an Hühnern, die mit Reis gefüttert wurden, ausführte, von der wunderbaren Wirksamkeit dieser Substanz. Meine Versuche, diese Substanz krystallinisch zu gewinnen, blieben trotz größter Anstrengung ergebnislos, und es ging nicht so wie bei *C. Funk*, *C. N. Meyers* und *C. Voetlin*[22]), die sie leicht in Krystallform überführen konnten. Meine Versuche mit Säuren, Goldchlorid, Platinchlorid und Pikrolonsäure sind ergebnislos geblieben. Schließlich findet man, daß diese Substanz durch in Wasser gelöster Pikrinsäure goldgelb ausfällt und der Niederschlag sich in Alkohol und heißem Wasser leicht löst. Man läßt sie aus der Wasserlösung auskrystallisieren, erhält aber nur krystallähnliche Gebilde und keine regulären Krystalle.

Um sich über die Löslichkeit der Substanz in Alkohol zu vergewissern, fügt man ihr in 70%, 80% und 90% Verhältnis Alkohol hinzu, jedoch fällt ein Teil schon in 80% Alkohol und in 90% fast alles aus. Dieser Niederschlag wird mit absolutem Alkohol und dann mit Äther ausgewaschen, im Exsiccator getrocknet und ergibt ein weißgraues Pulver.

Dieses enthält noch etwas Farbstoff, der nicht vollständig herausgeschafft werden konnte, denn verwendet man Tierkohle, so wird der Hauptteil des Vitamins B mit dem Farbstoff absorbiert.

Als einziger Weg zur Reinigung verbleibt nur die Auskrystallisierung. Wenn einmal diese Substanz angesäuert ist, löst sie sich in konzentriertem Alkohol und kann nicht mehr durch Alkohol ausgefällt werden. Dieses ist eine sehr interessante Tatsache, *C. Funk* bemerkte, daß er mit absolutem Alkohol aus der Reiskleie die wirksame Substanz, jedoch aus der Hefe nur einen kleinen Teil davon, extrahiert habe. *Th. B. Osborne, L. B. Mendel*[25]), *J. C. Drummod*[26]), *Alf. J. Wakmann*[27]) stellten fest, daß Vitamin B, welches aus der Hefe erhalten wurde, in absolutem Alkohol unlöslich ist; *E. V. Mac Collum* und *N. Simmonds*[28]) sagen, daß Vitamin B, hergestellt aus der Hefe, in 95% Alkohol unlöslich sei. Dagegen haben *H. Fraser* und *A. T. Stanton*[29]) die wirksame Substanz aus der Reiskleie mit absolutem Alkohol und *Cooper*[30]) aus dem Fleischpulver extrahiert. Wiederum haben *E. B. Vedder* und *R. R. Williams* das Vitamin aus der Reiskleie mit 95% Alkohol vollständig extrahieren können. *C. B. N. Meyers* und *C. Voegtlin* haben die wirksame Substanz aus der Hefe mit saurem Methylalkohol vollständig extrahiert. Diese Widersprüche rühren wohl von den angewandten Materialien, die sauer oder alkalisch waren. Die Substanz, die ich nach der schon erwähnten Methode erhalten habe, war in konzentriertem Alkohol schwer, aber im Wasser sehr leicht löslich, während die Biuret-, Xanthin-, Murexid-, *Millon*sche und Diazoreaktionen negativ waren, war die *Folin-Mac Collum-Denni*sche Harnsäurereaktion schwach positiv. Diese letztere ist, wie *C. Funk* richtig bemerkt, nicht die Reaktion des Vitamins selbst. Aber daß die Substanz keine Harnsäure enthält, beweist der negative Ausfall der *Benedict-Hitchcock*schen Reaktion. Diese Substanz fällt vollständig mit Gerbsäure und ein Teil mit der Sublimatlösung aus. 5—6 mg dieser wirksamen Substanz genügen manchmal, die erkrankten Hühner zu heilen, jedoch ist Heilung bei Verwendung von 10—15 mg in einigen Stunden sicher.

Nachdem das Ammoniak vollständig vertrieben worden ist, habe ich die Beziehung des Stickstoffs- und Aminostickstoffs erforscht und mittels der *Bangs-Mikro-Kjeldal*-Verfahren 5,6% Stickstoff bestimmt. Einen Teil des gesamten Stickstoffs habe ich mit dem *Van Slyke*schen Apparat als Aminostickstoff wiedergefunden.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Vitamin B.

(Vergleich mit den anderen ähnlichen Substanzen.)

	Vitamin B	Histidin	Allantoin	Cytosin	Urazil	Thymin
Krystallform	?	nadel- od. tafelörmig	Prismen	Plättchen	Nadel	Plättchen od. Nadel
Die löslich in Wasser	leicht löslich	leicht löslich	schwer in kaltem, leicht in heißem	schwer löslich	schwer in kaltem, leicht in heißem	schwer in kaltem, leicht in heißem
Die löslich in Äther	nicht löslich	nicht löslich	nicht löslich	nicht löslich	nicht löslich	schwer löslich
Die löslich in Alkohol	nicht löslich	teils löslich	unlöslich in kaltem etwas löslich in heißem	schwer löslich	nicht löslich	sehr schwer löslich
Phosphorwolframsäure	fällbar aus H_2SO_4 oder HCl-Lösung	fällbar aus H_2SO_4 oder HCl-Lösg.	nicht fällbar	fällbar	nicht fällbar	nicht fällbar
$AgNO_3$ und $Ba(OH)_2$	fällbar	fällbar	fällbar	fällbar (durch überschüssiges Baryt)	fällbar	fällbar
$AgNO_3$ und NH_3OH	fällbar, aber im Überschuß von NH_3OH wieder löslich	fällbar, aber i. Überschuß von NH_3OH wieder lösl.	fällbar, aber im Überschuß von NH_3OH wieder löslich	fällbar, aber im Überschuß von NH_3OH wieder löslich	fällbar, aber im Überschuß von NH_3OH wieder löslich	fällbar, aber i. Überschuß von NH_3OH wieder lösl.
Sublimat	teils fällbar	fällbar				
in Alkali	leicht zersetzlich		leicht zersetzlich	leicht zersetzlich		
Diazoreakt	(−)	(+)				

3. Behandlung von F. 3.

Der Niederschlag wird in verdünnter Schwefelsäure gelöst, entfernt man zuerst das Silber und dann die Schwefelsäure, so enthält das Filtrat nur noch Stickstoff. Hierauf wird es mit 50% Natronlaugelösung gekocht, und man bemerkt das Entstehen des Ammoniaks. Mißt man nun nach der *Van Slyke*schen Methode, so zeigt sich, daß der größte Teil des Stickstoffs dem Argininstickstoff gleich ist.
Daraus habe ich Argininpikrolonat auskrystallisiert (s. Photographie 7).

4. Behandlung von F. 4.

Die Lösung von F. 4 dampft man sirupös ein, fügt ihr konzentrierte Chlorwasserstoffsäure hinzu und trocknet sie nach der Abdampfung im Exsiccator. Nach längerem Stehenlassen extrahiert man sie mit absolutem Alkohol, und kocht sie dann mit 85% Alkohol aus. Bringt man zu diesem ersten Extrakt alkoholische Sublimatlösung hinzu, so entsteht ein Niederschlag, der aus Quecksilbersalz des Cholinhydrochlorids besteht. Fügt man sodann dem zweiten Extrakt alkoholische Sublimatlösung hinzu, so erwartet man einen Betainniederschlag, aber es fällt nichts aus. Der Rückstand wird mit Methylalkohol extrahiert.

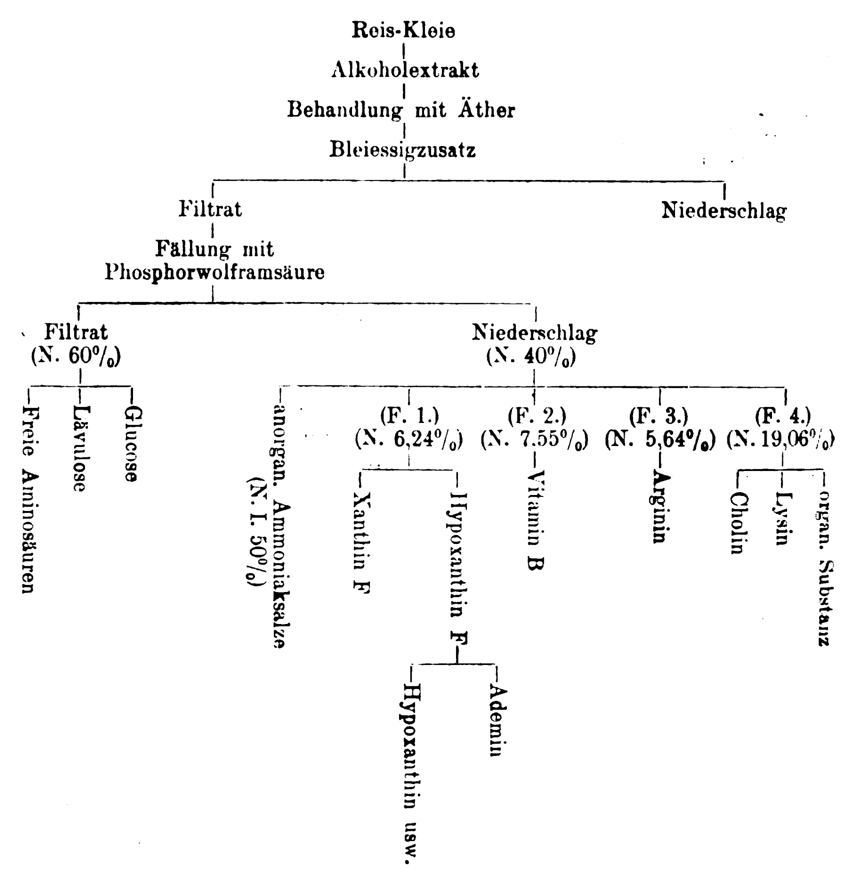
Der Methylalkohol wird abgedampft, dann löst man den Rückstand in Wasser und trennt nach der *Winterstein*schen Methode das Lysin. Im Rückstand ist Ornithin nicht nachzuweisen. Am Schlusse werden alle Filtrate gesammelt. Das Quecksilber und hierauf das Barium wird entfernt, und man fügt ihm in 5% Verhältnis Schwefelsäure und konzentrierte Phosphorwolframsäure hinzu, wodurch ein Niederschlag entsteht, löst diesen in Baryt, und nach dessen vollständiger Entziehung dampft man ab.

Löst man den Rest in Alkohol, so entsteht durch Hinzufügen von alkoholischer Pikrinsäurelösung ein Niederschlag.

Dieser ist goldgelb und ist in Alkohol schwer und in heißem Wasser leicht löslich. Läßt man ihn aus der Kaltwasserlösung auskrystallisieren, so entstehen goldgelbe Tafeln. Diese haben den Schmelzpunkt 280° C. Diese Substanz ist organisch, aber ihr Wesen ist noch nicht klar.

5. *Behandlung des Filtrats A.*

Mit reichlichem Barytpulver entfernt man aus dem Filtrat Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure. Das Filtrat ist dann von süßlichem Geschmack und enthält stark reduzierende Substanzen.



Diese Reduktionskraft ist wohl durch die vielen Zucker, die sie enthält, bedingt. Nach Abscheiden der Glucose enthält sie noch Zucker, und dieser ist hauptsächlich Lävulose. Außer diesen Zuckerarten sind noch freie Aminosäuren vorhanden, aber kein Tryptophan.

Im vorstehenden ist die schematische Darstellung des chemischen Vorganges sowie die Stickstoffverteilung veranschaulicht.

B. Über Wasserextrakt der Reiskleie.

Der Wasserextrakt der Reiskleie enthält nur wenig Fett, dagegen verhältnismäßig viel Protein. Daher säuert man ihn mit Essigsäure an, kocht und entfernt das Eiweiß. Das mit Bleiessig gereinigte Filtrat behandelt man wie den Alkoholextrakt und erhält fast das gleiche Resultat.

III. Untersuchung des Vitamins B.

Ich will nach vorhergegangener Untersuchung der Reiskleie nun feststellen, in welchem Zustand sich Vitamin in der Reiskleie befindet, und in welchen der vorhererwähnten chemischen Prozesse es übergegangen ist. Zu diesem Zweck habe ich seine antineuritische Wirkung an jungen Mäusen untersucht.

a) *Durch Bleiessig fällbare Substanzen.*

Der Niederschlag wird 30 Tage lang mit Wasser ausgewaschen. Nach Beseitigung der absorbierten Substanzen fällt man das Blei mit Schwefelwasserstoff heraus und gibt den erkrankten Hühnern davon ein, aber ohne jede Wirkung, wie schon früher *Hanshoff Pal*[31]), *M. Kumagawa*[32]), *E. B. Vedder* und *R. R. Williams*[19]) berichteten.

b) *Durch Phosphorwolframsäure fällbare Substanzen.*

Den Niederschlag, der durch Phosphorwolframsäure entstanden ist, trennt man mit Baryt in F. 1, F. 2, F. 3 und F. 4.

Hierauf wird in jedem Falle die antineuritische Wirkung untersucht. Dieselbe kann man nur bei F. 2 feststellen.

c) *Wachstumsfördernde Wirkung.*

E. V. Mc Collum und *C. Kennedy* haben bestimmt versichert, daß das wasserlösliche Vitamin B antineuritisch und wachstumsfördernd ist; aber kürzlich haben *A. P. Emmet* und *G. O. Luros*[33]) die antineuritische Substanz für Hühner und die wachstumsfördernde Substanz für Ratten als verschieden hingestellt. *E. V. Mc Collum* und *Davis*[34]) haben angegeben, daß zum normalen Wachstum eines Tieres Vitamin A und B notwendig sind. Schließlich hat *Funk*[35]) beobachtet, daß junge Hühner, die ausschließlich mit Reis und Reiskleie gefüttert wurden, zwar am Leben bleiben, aber nicht wachsen. *H. H. Mitchell*[36]) hält die beiden Vitamine für sehr ähnlich, aber glaubt, daß kein Grund vorliege, sie als gleich zu betrachten.

Um diese Frage zu lösen, habe ich Hühner ausschließlich mit poliertem Reis gefüttert.

Den erkrankenden Hühnern wurde die vorher abgetrennte *antineuritische Substanz* gegeben, und wie aus der graphischen Darstellung (Abb. 1) ersichtlich, sind alle prompt geheilt; aber eine Gewichtszunahme des Körpers findet nicht statt. Gibt man ihnen aber eine größere Quantität oder täglich eine bestimmte Menge dieser Substanz, so ist die Zunahme des Körpergewichts zu beobachten.

Abb. 1. Heilende Wirkung des Vitamins B bei 2 Hühnern, welche mit Reis gefüttert waren.

Dann wurden Mäuse nur mit poliertem Reis gefüttert. Schon nach 2—3 Wochen magern die Tiere ab und gehen ein. Gibt man ihnen aber polierten Reis und Reiskleie, so gedeihen sie ohne Störung (Tabelle I). Auf diese Erfahrung hin habe ich ihnen polierten Reis mit den verschiedenen Substanzen, die ich vorher aus der Reiskleie auf chemischem Weg gewonnen hatte, gegeben. Nur, was ich als *antineuritische Substanz* bzw. Vitamin B abgetrennt habe, hat eine Wirkung gehabt (s. Abb. 2, 3); aber alle anderen, Lysin, Arginin, Purine, Cholin usw. sind wirkungslos geblieben.

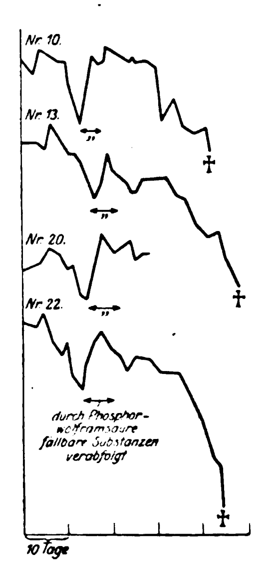


Abb. 2. Heilende Wirkung des Phosphorwolframsäure-Niederschlags bei Mäusen.

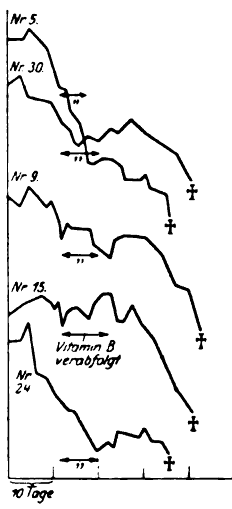


Abb. 3. Vitamin B, isoliert aus der gleichen Menge des Phosphorwolframsäure-Niederschlags (s. Abb. 2), aber der wirksame Bestandteil ist nicht gleich und dessen größerer Teil bei der chem. Behandlung verschwunden.

Jetzt ist noch festzustellen, wie lange die Tiere mit poliertem Reis und Vitamin B leben können.

d) Versuche über die Dialysierbarkeit des Vitamins B.

Die Dialysierbarkeit des Vitamins B wurde von *Funk* und anderen nachgewiesen. Nicht hydrolysierter Reiskleienextrakt wird abgedampft und in eine Tiermembran gelegt. Nachdem 2 Wochen lang dialysiert worden ist, untersucht man das Dialysat und den Rückstand.

Im ersteren sind antineuritische und wachstumfördernde Wirkungen festzustellen, aber im letzteren nicht (Abb. 4).

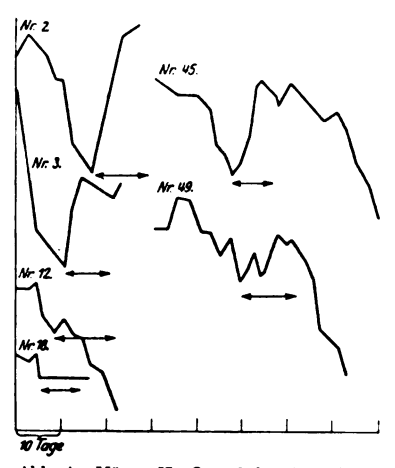


Abb. 4. Mäuse Nr. 2 und 8 gefüttert mit dialysierter Substanz. Mäuse Nr. 12 und 18 gefüttert mit dem Rückstand des Dialysats. Mäuse Nr. 45 und 49 gefüttert mit allen andern Basen des Extrakts, ausgenommen Cholin.

e) Versuche über die Absorbierbarkeit des Vitamins B.

Chamberlain, *N. Vedder*[37]) und *R. R. Williams* berichten über die Absorbierbarkeit des Vitamins B durch Tierkohlen. *Emmet* und *Mc Kinn*[38]) und *Seidel*[39]) stellten fest, daß Vitamin B vom *Lloyd*schen Reagenz oder von der *Füller*schen Erde, aber schwer von der Kieselgur absorbiert wird. Nach meinen Experimenten hängt die Absorbierung mehr oder weniger von den Substanzen ab. Man beobachtet, daß es am kräftigsten von den Metallsulfiden, besonders denen des Silbers und Bleis, absorbiert wird. Im folgenden ist die Absorbierungsfähigkeit der Reihe nach angeführt: Tierkohle, Kaolin, Blei-, Silbersulfid, Kieselgur, Blei- und Bariumsulfat. *Vedder* und *Williams* haben gewußt, daß in der Reiskleie Vitamin B reichlich vorhanden ist, aber nach der *Funk*schen Methode nur ein geringer Prozentsatz davon gewonnen werden kann. Dies rührte daher, daß bei der chemischen Manipulation ein großer Teil von Baryt zersetzt wurde. Nach meiner Ansicht wird es von Baryt weniger zersetzt, aber von den Metallsulfiden absorbiert.

f) Bemerkungen zum Silbernitrat- und Barytverfahren.

Wie im vorhergehenden Kapitel erwähnt, kann Vitamin B aus saurer Silbernitratlösung mit Baryt bei neutraler oder schwachalkalischer Reaktion ausgefällt werden.

C. Funk, *M. Kumagawa* und andere haben erfolglos versucht, *direkt* aus dem Reiskleienextrakt Vitamin B zu extrahieren. Ich habe dies auch mehrfach probiert, aber mit dem gleichen Mißerfolge.

Edie, Evans, Moore, Simpson und *Webster*[40]) haben dagegen aus dem Hefenextrakt direkt den wirksamen Bestandteil isoliert. Bei dieser Methode ist meiner Ansicht nach der chemische Vorgang so erfolgt, daß das Vitamin B eine Verbindung mit Silberhydroxyd eingeht und ausfällt:

$$2\,AgNO_3\,Ba(OH)_2 \rightleftarrows 2\,AgOH\,Ba(NO_3)_2$$
$$AgNO_3\,NH_3OH \rightleftarrows AgOH\,NH_3NO_3$$
Vitamin B AgOH-Niederschlag.

In dem Reiskleienextrakt befinden sich aber, wie vorher erwähnt, stark reduzierende Substanzen, wie Glucose und Lävulose, und in der durch Baryt alkalisch gewordenen Lösung wird sofort AgOH reduziert, daher ist es möglich, daß Vitamin B, welches mit AgOH einmal verbunden ist, wieder frei wird und nicht ausfällt. Um über diese Tatsache Klarheit zu gewinnen, habe ich Hefe dem Reiskleienextrakt hinzugefügt und die Mischung einige Tage in der Zimmertemperatur belassen. Nachdem die Zuckerarten fast vollständig verschwunden sind, wird nach der Silbernitrat-Barytmethode erfolgreich der wirksame Bestandteil isoliert.

Die Substanz, die zuletzt erhalten wird, zeigt die Biuretreaktion, die aber nicht durch Vitamin B selbst, sondern durch die Substanzen, die aus der Hefe stammen, bedingt ist.

IV. Darstellungsmethode des Vitamins B.

Theorie: Um das Vitamin B aus dem Reiskleienextrakt zu isolieren, wird es zuerst mittels Phosphorwolfram- oder Gerbsäure ausgefällt, um es mit anderen Basen von reduzierenden Substanzen zu trennen. Hierauf wird mit Silbernitrat und Baryt das Vitamin B von den anderen Basen getrennt. Um die Metalle herauszuschaffen, muß man Schwefelwasserstoff möglichst vermeiden. Außerdem muß man sich vor überschüssigem Baryt und dem Erhitzen der Lösung, wenn sie alkalisch ist, hüten.

Ausführung: Auf 1 kg Reiskleie gießt man 3 l Wasser und extrahiert sie ungefähr 2 Stunden lang auf dem Wasserbad und filtriert. Das Filtrat läßt man auf dem Wasserbad zum Sirup einkochen, fügt ihm 75% Alkohol zu und entfernt den in größter Menge entstehenden Niederschlag. Hierauf vertreibt man den Alkohol, entfernt das Fett und Lipoid mittels Äthers, löst den Rest in Wasser und fügt Bleiessig unter Vermeidung eines Überschusses hinzu. Den entstehenden Niederschlag nimmt man heraus, gießt zu dem Filtrat verdünnte Schwefelsäure und beseitigt das Bleisulfat. Hierauf fügt man ihm in 5% Verhältnis Schwefelsäure und konzentrierte Phosphorwolframsäurelösung hinzu und sammelt den entstehenden Niederschlag, der mit 5% Schwefelsäurelösung gut ausgewaschen wird. Darauf zersetzt man ihn mit Baryt und sammelt das Filtrat. Nach Beseitigung des Bariums säuert man mit Salpetersäure an und fügt Silbernitrat hinzu.

Den entstandenen Niederschlag entfernt man und macht das Filtrat mit Barytwasser schwach alkalisch, wodurch sich ein Niederschlag bildet. Den Niederschlag löst man in verdünnter Schwefelsäure und entzieht ihm das Silber mit Schwefelwasserstoff. Nach Beseitigung der Schwefelsäure erhält man eine fast neutrale Flüssigkeit. Diese säuert man mit Salpetersäure an, dampft sie auf dem Wasserbad ein und trocknet. Dann extrahiert man den Rückstand mit 10% Silbernitratlösung.

Tabelle I.

Mäuse gefüttert mit Reis und Reiskleie.

Nr. I		Nr. II		Nr. III		Nr. IV	
Datum	Körpergewicht g	Datum	Körpergewicht g	Datum	Körpergewicht g	Datum	Körpergewicht g
9. I.	8,3	9. I.	11,4	9. I.	—	9. I.	9,8
11. I.	7,8	11. I.	11,8	11. I.	—	11. I.	9,4
13. I.	8,9	13. I.	12,9	13. I.	7,7	13. I.	10,2
15. I.	8,9	15. I.	12,7	15. I.	8,0	15. I.	10,9
17. I.	9,4	17. I.	12,7	17. I.	8,1	17. I.	11,6
18. I.	9,6	18. I.	12,9	18. I.	8,1	18. I.	11,7
19. I.	9,8	19. I.	12,4	19. I.	8,5	19. I.	11,9
20. I.	9,7	20. I.	13,2	20. I.	8,7	20. I.	12,2
23. I.	9,9	23. I.	13,9	23. I.	9,0	23. I.	12,2
24. I.	9,9	24. I.	13,5	24. I.	8,7	24. I.	12,5
26. I.	9,8	26. I.	13,0	26. I.	8,9	26. I.	12,1

Tabelle II.

Mäuse gefüttert mit Reis und Arginin.

Nr. I			Nr. II			Nr. III			Nr. IV		
Datum	Körpergewicht g		Datum	Körpergewicht g		Datum	Körpergewicht g		Datum	Körpergewicht g	
9. I.	8,2		9. I.	7,6		9. I.	8,2		9. I.	8,0	
11. I.	8,1		11. I.	7,6		11. I.	8,0		11. I.	8,1	
13. I.	8,3		13. I.	7,9		13. I.	8,4		13. I.	8,3	
15. I.	7,9		15. I.	7,2		15. I.	7,8		15. I.	7,5	
17. I.	7,6		17. I.	7,2		17. I.	7,4		17. I.	7,2	
18. I.	7,6		18. I.	7,1		18. I.	7,4		18. I.	6,9	Arginin
19. I.	7,3	Arginin	19. I.	6,9	Arginin	19. I.	7,3	Arginin	19. I.	6,9	Arginin
20. I.	7,2	Arginin	20. I.	6,6	Arginin	20. I.	7,2	Arginin	20. I.	6,1	Arginin
21. I.	7,2	Arginin	21. I.	6,4	Arginin	21. I.	7,2	Arginin	21. I.	—	
22. I.	7,1	Arginin	22. I.	6,7	Arginin	22. I.	7,1	Arginin	22. I.	—	
23. I.	7,0	Arginin	23. I.	6,4	Arginin	23. I.	7,1	Arginin	—	—	
24. I.	6,8	Arginin	24. I.	6,3	Arginin	24. I.	6,9	Arginin	—	—	
25. I.	6,6	Arginin	25. I.	6,0	Arginin	25. I.	6,7	Arginin	—	—	
26. I.	6,5		26. I.	5,9	Arginin	26. I.	6,5		—	—	
27. I.	5,7		27. I.	5,6		27. I.	6,3		—	—	
29. I.	—		29. I.	5,3		29. I.	6,2		—	—	
31. I.	—		—	—		31. I.	5,7		—	—	
1. II.	—		—	—		1. II.	5,2		—	—	
2. II.	—		—	—		2. II.	—		—	—	
3. II.	—		—	—		3. II.	—		—	—	

Tabelle III.

Mäuse gefüttert mit Reis und Lysin.

Nr. XXVII			Nr. XXVI			Nr. XXIX			Nr. XXV		
Datum	Körpergewicht g		Datum	Körpergewicht g		Datum	Körpergewicht g		Datum	Körpergewicht g	
9. I.	7.3		13. I.	8,1		9. I.	8,2		9. I.	8,0	
11. I.	7,4		15. I.	7,7		11. I.	7,4		11. I.	7,5	
13. I.	8,0		17. I.	7,1		13. I.	7,3		13. I.	8,1	
15. I.	7,1		18. I.	7,2		15. I.	6,7		15. I.	7,5	
17. I.	6,9		19. I.	7,0		17. I.	6,5		17. I.	6,9	
18. I.	6,9		20. I.	6,5		18. I.	6.4		18. I.	7,15	Lysin
19. I.	6,6		21. I.	6,3	Lysin	19. I.	6,0	Lysin	19. I.	6.9	
20. I.	6,2	Lysin	22. I.	6,6		20. I.	5,5		20. I.	6,2	
21. I.	6,2		23. I.	6,6		21. I.	5,4		21. I.	—	
22. I.	6,2		24. I.	6,4		22. I.	5.4		—	—	
23. I.	6,1		25. I.	6,3		23. I.	5,3		—	—	
24. I.	5,8		26. I.	6,0		24. I.	5,4		—	—	
25. I.	5,7		28. I.	5,9		25. I.	5,1		—	—	
26. I.	5,8		29. I.	5,7		26. I.	4.9		—	—	
28. I.	5,7		31. I.	5,2		28. I.	—		—	—	
29. I.	5,6		—	—		29. I.	—		—	—	
31. I.	5,2		—	—		31. I.	—		—	—	

Tabelle IV.

Mäuse gefüttert mit Reis und organ. Substanz, welche aus Reiskleienextrakt gewonnen.

Nr. VI			Nr. XXIX		
Datum	Körpergewicht g		Datum	Körpergewicht g	
17. I.	9,0		9. I.	10,5	
18. I.	8,8		11. I.	10,8	
19. I.	9,0		13. I.	10,8	
20. I.	8,9		15. I.	9,9	
21. I.	8,9		17. I.	10,7	
22. I.	8,5		18. I.	10,8	
23. I.	8,4		19. I.	9,2	
24. I.	8,0		20. I.	9,5	
25. I.	7,5		21. I.	8,8	
26. I.	7,3		22. I.	8,9	
27. I.	7,2		23. I.	8,9	Org. Subst.
29. I.	6,7		24. I.	8,6	
31. I.	6,4		25. I.	8,1	
1. II.	6,5		26. I.	—	
2. II.	6,2	Org. Subst.	—	—	
3. II.	6,2		—	—	
4. II.	6,2		—	—	

Wenn man dem Filtrat ammoniakalische Silbernitratlösung vorsichtig hinzufügt, so entsteht ein flockiger Niederschlag. Diesen löst man in verdünnter Schwefelsäure und fällt mittels Schwefelwasserstoffs (oder Salzsäure) das Silber heraus. Nach der Einengung der fast neutralen

Lösung gießt man die zehnfache Menge ihres Volumens absoluten Alkohol hinzu, wodurch sich ein Niederschlag bildet, der mit der Zentrifuge gesammelt wird. Man wäscht ihn zuerst mit absolutem Alkohol und dann mit Äther, trocknet im Exsiccator und erhält ein grauweißes Pulver. Von diesem genügen 5—6 mg, um eine antineuritische Wirkung bei Hühnern, die an Polyneuritis leiden, hervorzurufen. Aus 4 kg Reiskleie kann man 0,3—0,5 kg von diesem Pulver darstellen. (Wenn man nach der Hydrolisierung der Reiskleie die Isolierung vornimmt, so entsteht Histidin aus dem Eiweiß, wodurch die Trennung des Histidins vom Vitamin B sich viel schwieriger gestaltet.)

Tabelle V.
Mäuse gefüttert mit Reis und Purinbasen.

Nr. XXXIV		Nr. XLVII		Nr. XLVIII		Nr. XLVI	
Datum	Körpergewicht g	Datum	Körpergewicht g	Datum	Körpergewicht g	Datum	Körpergewicht g
2. II.	8,1	2. II.	7,9	2. II.	8,0	13. II.	11,9
5. II.	8,2	5. II.	8,1	5. II.	8,1	16. II.	11,8
7. II.	7,7	7. II.	8,2	7. II.	8,3	19. II.	10,1
9. II.	7,0	9. II.	8,2	9. II.	8,3	21. II.	11,2
12. II.	6,6 Purinbasen	12. II.	6,5 } Purinbasen	12. II.	7,7	23. II.	11,2
14. II.	6,6	14. II.	6,0 }	14. II.	6,9 } Purinbasen	24. II.	11,7
16. II.	6,5	16. II.	—	16. II.	6,9 }	25. II.	11,2
—	—	—	—	19. II.	6,3 }	26. II.	10,9
—	—	—	—	20. II.	6,0 }	28. II.	10,6 } Purinbasen
—	—	—	—	—	—	1. III.	10,3 }
—	—	—	—	—	—	2. III.	9,7 }
—	—	—	—	—	—	3. III.	9,6 }
—	—	—	—	—	—	4. III.	9,5 }
—	—	—	—	—	—	5. III.	—

Tabelle VI.
Mäuse gefüttert mit Reis und Cholin.

Nr. LIX		Nr. LX		Nr. LXVI	
Datum	Körpergewicht g	Datum	Körpergewicht g	Datum	Körpergewicht g
13. II.	11,4	24. II.	16,9	24. II.	2,3
21. II.	10,6	26. II.	17,6	29. II.	2,8
23. II.	11,4	28. II.	17,2	28. II.	2,3
24. II.	11,0	3. III.	17,1	3. III.	2,1
26. II.	10,9	5. III.	17,0	5. III.	10,6
28. II.	10,8	7. III.	15,9	7. III.	9,3
1. III.	10,0	9. III.	15,1 } Cholin	9. III.	8,7 } Cholin
3. III.	9,9 } Cholin	10. III.	13,3 }	10. III.	7,6 }
4. III.	9,6 }	13. III.	13,3 }	14. III.	—
5. III.	8,7 }	—	—	—	—
7. III.	8,4 }	—	—	—	—
9. III.	8,0 }	—	—	—	—
10. III.	7,0 }	—	—	—	—

Zusammenfassung.

1. Der Reiskleienextrakt enthält vor der Hydrolyse folgende Bestandteile: Purinbasen (Adenin, Hypoxanthin usw.), Aminosäuren (Arginin, Lysin und andere freie Aminosäuren, aber kein Histidin und Tryptophan sind nicht nachweisbar); Cholin ist vorhanden, Betaine fehlen. Außerdem enthält er noch Zuckerarten, wie Glucose und Laevulose und organische Substanzen.

22. Vitamin B hat folgende chemische Eigenschaften:

a) Nicht fällbar durch Bleiessig aus saurer Lösung.

2b) Vollständig fällbar durch Phosphorwolframsäure aus schwefel- oder salzsaurer Lösung.

c) Fällbar durch Silbernitratlösung nebst Baryt bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion.

d) Fällbar durch ammoniakalische Silbernitratlösung, jedoch im Überschuß von Ammoniak wieder löslich. Wie im Fall c wird das Ausfällen durch die reduzierenden Substanzen gehindert.

e) Fällbar durch Gerb- und Pikrinsäuren. Das Pikrat ist in Alkohol und heißem Wasser löslich. Ein Teil fällt durch Sublimat, jedoch durch Gold-, Platinchlorid und Pikrolonsäure nicht.

f) Biuret-, *Schmidt*sche-, *Millon*sche-, *Weidel*sche-, Xanthin-, Murexid- sowie Diazoreaktionen sind alle negativ; während die *Folin-Mc Collum-Denische* Harnsäurereaktion schwach positiv ist. Diese scheint aber nicht die Reaktion des Vitamins B selbst zu sein.

g) Im neutralen Zustand ist Vitamin B im Alkohol von über 80% nicht löslich, aber leicht löslich in saurem Alkohol und Wasser.

h) Vitamin B ist antineuritisch und gleichzeitig wachstumsfördernd. Falls man größere Mengen benutzt, als es notwendig ist, die antineuritische Wirkung hervorzurufen, oder täglich eine bestimmte Menge verwendet, so kann man die wachstumsfördernde Wirkung gut beobachten. Der Grund dafür ist, wie *Funk* sagt, „Vitamines act as tonus regulators throughout the whole body, stimulating the secretions of saliva, gastric juice, bile, and pancreatic juice; the action being apparently exerted through the para-Sympathetic terminals“.

i) Vitamin B ist stark absorbierbar, besonders wird es gierig von der Tierkohle und Metallsulfiden absorbiert.

j) Vitamin B ist dialysierbar.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. *H. Hayashi* und Dr. *T. Komoto*, die mir unermüdlich mit Rat und Tat beigestanden haben, und Herrn Prof. *M. Nagayo* für ihre liebenswürdige Hilfe herzlichst danken.

Literatur.

[1]) *Eijkman, C.*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **148**, 528. 1897; **149**, 187. 1897; Arch. f. Hyg. **58**, 150. 1906. — [2]) *Bléadat*, Bull. de la soc. de pathol. exot. **13**. 1901. — [3]) *Gryns*, Nederlandsch Tijdschr. v. Geneesk. **41**, 191. 1901; **49**. 1909. — [4]) Journ. of physiol. **36**, 64. 1907—1908. — [5]) *Fraser, Henry*, and *A. T. Stanton*, Lancet 1900, S. 4515. — [6]) *Fraser, Henry*, The etiology of Beriberi. Studies from the Institute of med. reserch malay States 1909. — [7]) Diese Zeitschr. **32**, 189. 1911; II. Philippine Journ. of science 1910. — [8]) Philippine Journ. of science **5**, 127. 1910. — [9]) *Urbeanu, A.*, Die Gefahr einer an Kalium zu armen Ernährungsweise. Wien 1916. — [10]) *Hijkman, C.*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **17**, Nr. 10. 1913. — [11]) *Schaumann, H.*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **19**, 393. 1915; Dtsch. med. Wochenschr. **8**, 783. 1909; Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **18**, Beiheft 6. 1914. — [12]) *Schaumann, H.*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **16**, 361. — [13]) *Roehmann, F.*, Über künstliche Ernährung und Vitamin. 1916. — [14]) *Eijkman*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **15**, 53. 1911. — [15]) *Funk, C.*, Journ. of the State med. 1912. — [16]) *Williams* und *Seidell*, Journ. of biol. chem. **26**, 431. 1916; *Williams*, Journ. of biol. chem. **29**, 495. 1917. — [17]) *Suzuki, Shimamura, Odake*, Journ. of college of Arg. Imp. Univ., Tokio Nr. 4. Marsch. 1913. — [18]) *Oseki, S.*, Nippon Byorigakkai Kaishi **11**, 29. 1921. — [19]) *Vedder, E. B.*, und *R. R. Williams*, Philippine Journ. of science, sect. B. Trop. med. **8**, Nr. 3, S. 175—195. 1913. — [20]) *Schaumann, H.*, l. c. S. 12. — [21]) *Drummond, J. C.*, und *C. Funk*, Biochemical Journ. **8**. 1914. — [22]) *Meyers, C. N.*, und *C. Voegtlin*, Journ. of biol. chem. **42**, Nr. 1. 1920. — [23]) *Williams, R. R.*, und *N. M. Saleeby*, Philippine Journ. of science, sect. B **10**, Nr. 2. 1915. — [24]) *Krueger, M.*, und *G. Salmon*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 373. 1898. — [25]) *Osborne, Th. B.*, und *L. B. Meudel*, Journ .of biol. chem. **31**, 158. 1917. — [26]) *Drummond, J. C.*, Biochemical Journ. **11**, 261. 1917. — [27]) *Osborne*, alf. *J. Wakman*, Journ. of biol. chem. **40**, 383. 1919. — [28]) *Mc Collum, E. V.*, und *N. Simonds*, Journ. of biol. chem. **33**, 26. 1918. — *Fraser, H.*, *A. T. Stanton*, Lancet, **2**, 1755. 1910. — [30]) *Cooper, E. A.*, Journ. of hyg. **12**, 436. 1912; **14**, 12. 1914. — [31]) *Hanshoff, Pal*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **14**, Beih. 3. 1910. — [32]) *Kumagawa, M.*, Mitt. d. med. Ges. Tokio **33**, Nr. 6, S. 2. 1919. — [33]) *Emmet, A. D.*, und *G. O. Luros*, Journ. of biol. chem. **43**, Nr. 1. 1920. — [34]) *Mc Collum, E. v.*, und *M. Davis*, Journ. of biol. chem. **23**, Nr. 2. 1915. — [35]) *Funk, C.*, und *A. B. Mc Collum*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **92**, 13. 1914. — [36]) *Mitchel, H. H.*, Journ. of biol. chem. **40**, 399. 1919. — [37]) *Chamberlain* und *Vedder*, Philippine Journ. of science, sect. B. **6**, 251. 1911. — [38]) *Emmet* und *Mc Kinn*, Journ. of biol. chem. **32**, 409. 1917. — [39]) *Seidell, A.*, U. S. Rep. Public Health **31**, Nr. 7. 1916. — [40]) *Edie, Evans, Moore, Simpson* und *Webster*, Biochemical Journ. **6**, 238. 1912.

Über den Einfluß der Temperatur auf die Chlorophyllzersetzung durch das Licht.

Von

L. A. Iwanoff.

(Aus dem Botanischen Kabinett des Forstinstituts in Petersburg.)

(*Eingegangen am 14. April 1922.*)

Eine Eigentümlichkeit der photochemischen Reaktionen ist, wie bekannt, ihre geringe Abhängigkeit von der Temperatur. Der Temperaturkoeffizient, durch den diese Abhängigkeit bezeichnet wird, schwankt bei ihnen in den Grenzen 1—1,2, indem derselbe bei den Dunkelreaktionen bis zu 2—3 steigt. Nur die Reaktion der CO_2-Zersetzung bei der Photosynthese ist eine der wenigen Ausnahmen von dieser Regel. Der Temperaturkoeffizient dieser Reaktion innerhalb 0—30° schwankt wie bei den Dunkelreaktionen von 2,4—1,8. Da in der physiologischen Literatur wiederholt der Gedanke geäußert wurde, daß das Chlorophyll in dieser komplizierten Reaktion durch seine Zersetzung unter dem Einfluß des Lichtes teilnimmt, so wäre es interessant festzustellen, wie groß der Temperaturkoeffizient dieser leicht in vitro möglichen Reaktion ist. Ob ihr die Eigenschaft zugeschrieben werden kann, durch welche der ganze Prozeß der Photosynthese sich von den anderen photochemischen Reaktionen unterscheidet? Ohne eine endgültige Lösung dieser Frage zu erbringen, möchte ich in dieser Abhandlung nur einige hierher bezügliche Angaben, die beiläufig bei meiner Arbeit über ein anderes Thema erhalten wurden, mitteilen. Die Zersetzung des Chlorophylls wurde in den Terpentin-[1]) und Alkoholextrakten aus frischen Blättern von Aspidistra, sowie in durch Chlorophyll gefärbtem Kollodium beobachtet. Die optische Konzentration des Chlorophylls war in allen Versuchen derart, daß ihr Extinktionskoeffizient um eins schwankte. Schmale Probiergläser, welche 3 ccm der Lösung enthielten, wurden in große wassergefüllte Glasgefäße vertikal gestellt, in welchen, durch Zugießen von heißem Wasser oder durch Zufügen von Eis unter beständigem Rühren während des Versuches die Tem-

[1]) Der Terpentin wirkt stark beschleunigend auf die Chlorophyllzersetzung. *S. Reinke*, Botan. Ztg. **43**. 1885.

peratur gegen 5—6° oder 40° gehalten wurde. Die mit Kollodium bezogenen und durch Chlorophyll gefärbten Objektgläser, die zur Hälfte mit Stanniol bedeckt waren, befanden sich in den flachen Probiergläsern, welche in die obenerwähnten großen Gefäße gestellt wurden. Die Probiergläser wurden in Entfernung von 30 cm von einer 3000 m-Kerzenlampe „Nitra" beleuchtet. Nach Beendigung des Versuches wurden die Lösungen und Objektgläser mit Kollodiumschichten mit dem Spektrophotometer *Grünbaums* und *Martens* auf die Wellenlänge von 665 $\mu\mu$ geprüft. Die Zersetzung wird nach folgender Formel berechnet $\frac{\Delta c}{c} = \frac{\log tg^2 a_1 - \log tg^2 a_2}{\log tg^2 a_1 - \log tg^2 a_0}$, wo C die anfängliche Chlorophyllkonzentration, ΔC die Abnahme des Chlorophylls bei der Zersetzung, Winkel a_0 Drehungswinkel der Nicols bei gleicher Intensität des Feldes ohne Lösung, a_1 derselbe Winkel für die Kontrollösung (evtl. für die verdunkelte Hälfte der Objektgläser), a_2 derselbe Winkel für die Versuchslösung (evtl. für die beleuchtete Hälfte der Objektgläser) bedeutet. Nachdem das Verhältnis $\frac{\Delta C_1}{C_1}$ zu $\frac{\Delta C_2}{C_2}$ für die entsprechenden Temperaturen t_1 und t_2 gefunden, berechnete ich die Größe des Temperaturkoeffizienten nach der Formel:

$$\frac{K_t + 10}{K_t} = \sqrt[\frac{10}{t_2 - t_1}]{\frac{\Delta C_2 - C_2}{C_2 - \Delta C_1}}.$$

Die Resultate sind in folgender Tabelle I angegeben.

Tabelle I.

Insolationsdauer	t ° C	$\frac{\Delta C}{C}$	$\frac{K_t + 10}{K_t}$	
Chlorophyll in Terpentinlösung.				
30 Minuten	5	0,208	1,036	1,040
	38	0,234		
60 „	5	0,610	1,044	
	40	0,710		
Chlorophyll in Alkohollösung.				
30 Minuten	5	0,200	1,053	1,065
	40	0,240		
60 „	5	0,303	1,077	
	40	0,396		
Chlorophyll in Kollodium.				
45 Minuten	5	0,21	1,074	1,094
	40	0,27		
30 „	5	0.19	1,117	
	40	0,28		
30 „	5	0,19	1,093	
	40	0,26		

Die angegebenen Zahlen beweisen, daß die Zersetzung des gelösten Chlorophylls bei den verschiedenen Oxydationsbedingungen wie die anderen photochemischen Reaktionen einen sehr niedrigen Temperaturkoeffizient hat und folglich im Gegensatz zur Photosynthese wenig von der Temperatur abhängig ist. Jedoch bei dem Vergleiche der Zahlen kann man sehen, daß ihre Größe nicht ganz konstant bleibt, und zwar ist sie im Kollodium merkbar höher als im Alkohol oder im Terpentin. Bei weiteren Versuchen ergab es sich, daß eine noch größere Steigerung in dem Chlorophyll mit welchem Papier imprägniert war, stattfand.

Tabelle II.

Insolationszeit in Entfernung 40 ccm von der „Nitra"-Lampe	t° C	Insoliertes Papier	Ablesung des Photometers
60 Minuten	6 29	Chlorsilberpapier „Solio"	15 17
2 "	14 37	Chlorsilberpapier nach *Eder*	11 11
5 "	14 35	Bromsilberpapier nach *Eder*	19 20
215 "	6 36	Bromsilberpapier nach *Eder* unter rotem Lichtfilter	19 20
60 "	15 40	Bromsilberpapier nach *Eder* unter rotem Lichtfilter	12 12
15 "	18 39	Vorbelichtetes Bromsilberpapier unter rotem Lichtfilter	25 27
10 "	14 40	dgl.	26 28
5 "	15 40	dgl.	20 21
5 "	6 40	dgl.	23 26
5 "	9 32	dgl.	19 20

Diese Vergrößerung des *t*-Koeffizienten wurde zuerst in den Versuchen mit dem durch Chlorophyll sensibilisierten Chlor- und Bromsilberpapier beobachtet. Das nach *Eders* Methode angefertigte Papier wurde mit einer alkoholischen Chlorophyllösung sensibilisiert und dann in einem Papierskalenphotometer bei verschiedenen Temperaturen vor der „Nitra"-Lampe insoliert. Nach der Insolation wurden die Skalengrade notiert, bei welcher sich die Wirkung des Lichtes durch das Schwärzen des Papiers geäußert hatte. Zum Vergleiche sind in der Tabelle II die mit nichtsensibilisierten Chlor-Bromsilberpapier und Skalenphotometer ausgeführten Versuche angegeben.

Wir sehen, daß der Temperatureinfluß auf die Zersetzung der Chlor-Bromsilbersalze, entsprechend dem kleinen Temperaturkoeffizienten

dieser photochemischen Reaktion sich nur durch Differenz von 1—2 Skalengraden des Photometers für das Intervall von 20—30° kundgibt. Das durch Vorbeleuchtung für die gelben und roten Strahlen empfindlich gemachte Papier zeigt dieselbe Beziehung zur Temperatur. Aber auf dem mit Chlorophyll sensibilisierten Silberpapier und auf direkt mit Chlorophyll gefärbtem Papier steigt die Temperaturwirkung bedeutend, wie es die Zahlen der Tabelle III zeigen.

Tabelle III.

Insolationszeit und Entfernung von der „Nitra“-Lampe	t° C	Insoliertes Papier	Ablesung des Photometers
10 Minuten (30 cm)	11	Mit Chlorophyll sensibilisiertes Bromsilberpapier unter rotem Lichtfilter	27
	46		32
5 „ (30 cm)	5		21
	45		27
4 „ (40 cm)	5	Mit Chlorophyll sensibilisiertes Bromsilberpapier ohne Lichtfilter	17
	20		20
3 „ (40 cm)	7	dgl.	15
	20		18
60 „ (40 cm)	17	Mit Chlorophyll gefärbtes Papier ohne Lichtfilter	20
	39		30
15 „ (40 cm)	15		7
	40		12

Es ist klar, daß der Temperaturkoeffizient der Zersetzung des Chlorophylls auf Papier bedeutend größer als in den Lösungen ist und diese Steigerung bei Sensibilisation sich auf die Zersetzung der Silbersalze überträgt, zugleich steigt auch ihr Temperaturkoeffizient, wodurch nochmals bewiesen wird, daß der optische Sensibilisator zugleich auch der chemische Sensibilisator ist. Um genauer zu bestimmen, wie groß der Temperaturkoeffizient der Chlorophyllzersetzung auf Papier ist, habe ich aus dem mit Chlorophyll gleichmäßig gefärbten Filtrierpapier gleiche Streifen ausgeschnitten und eine von ihnen der Insolation, die andere der Dunkelheit unterworfen, und nachher jeden einzeln in Probiergläser mit 3 ccm Alkohol eingetaucht. Nach 12stündigem Aufenthalt im Dunkeln wurden die gefärbten Lösungen dem Photometrieren in dem Spektrophotometer unterworfen. Die Kontrollbestimmung zeigte, daß auf diese Weise aus gleichen Streifen Lösungen mit einer gleichen, in den Fehlergrenzen des Photometrierens liegenden Menge von Chlorophyll erhalten wurden.

Bei der Insolation während 45 Minuten in der Entfernung von 30 cm vor der „Nitra“-Lampe wurden bei 5°—22,2% im Vergleich zu den sich im Dunkeln befindenden Kontrollstreifen und bei 40°—33,3% erhalten, woraus sich der Temperaturkoeffizient gleich 1,255, d. h. bedeutend höher, als bei der Chlorophyllzersetzung in den Terpentin- und Alkohol-

lösungen berechnen läßt. Also bleibt der Temperaturkoeffizient der Chlorophyllzersetzung nicht konstant, und zwar ist derselbe im Kollodium höher als in der Alkohol- oder Terpentinlösung und noch bedeutend höher in dem Papier, worin das Chlorophyll nach der Verdunstung des flüssigen Lösungsmittels sich in der Art einer körnigen, amorphen mit fetten Extraktionsstoffen gemischten Masse auf den Papierfasern niederschlägt.

In bezug darauf kann man erwarten, daß bei den weiteren Untersuchungen des in Fett und Öl gelösten, sowie auch kolloidalen und in den verschiedenen Absorbenten absorbierten Chlorophylls noch höhere Koeffizienten beobachtet werden dürften, die dem Temperaturkoeffizient der Photosynthese noch näherstehen.

Stickstoffbestimmung im Liquor cerebrospinalis mittels Bangs Mikrokjeldahlmethode.

Von

P. A. Hoefer und Julie Mannheim.

(Aus der III. Medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 15. April 1922.)

Die bisher gebräuchlichen Methoden zur Eiweißbestimmung im Liquor cerebrospinalis, von denen einige exakte Bestimmungen ermöglichen, haben den Nachteil, daß sie größere Liquormengen erfordern als häufig zur Verfügung stehen. Es fehlte bisher an einer Methode, die bei Verwendung kleinster Materialmengen genaue Werte zu liefern imstande ist, an einer sicheren, leicht auszuführenden Mikromethode. Wir haben deshalb die von *Ivar Bang* für N-Bestimmungen im Blute angegebene Mikrokjeldahlmethode für Liquoruntersuchungen herangezogen, wobei wir nur dort unwesentliche Abweichungen von der Originalmethode einführten, wo sie durch den im Verhältnis zum Blutserum wesentlich geringeren Eiweiß- bzw. N-Gehalt des Liquors notwendig wurden.

Der Eiweißgehalt des Blutserums beträgt über 7%, der des normalen Liquors nach verschiedenen Autoren im Durchschnitt etwa 0,025%.

Während für die Bestimmung des Gesamtstickstoffes und Eiweißstickstoffes im Blute nach *Bang* etwa 20—30 mg Blut genügen und für die Bestimmung des Reststickstoffes 100 mg, mußten wir für die Bestimmungen im Liquor erheblich mehr Flüssigkeit verwenden.

Beim Vergleich zwischen mehreren Bestimmungen des Gesamt-N im Liquor fanden wir, daß wir nur dann untereinander übereinstimmende Resultate erhielten, wenn wir mindestens 0,3—0,5 ccm (am besten 0,5 ccm) Liquor verarbeiteten.

Hieraus ergab sich eine Notwendigkeit zur Abweichung von der Originalmethode, da wir die Torsionswage, die nur einen Meßbereich bis 500 mg hat, nicht mehr benutzen konnten und die von *Bang* angegebenen Papierplättchen soviel Flüssigkeit nicht aufsaugen können.

Diese Schwierigkeit ließe sich zwar durch Verwendung mehrerer Papierplättchen beseitigen, doch würde dadurch einmal der Fehler, der sich aus evtl. an den Plättchen haftenden Spuren von Ammoniak ergibt, gesteigert werden, und dann machte die größere Papiermenge

ein größeres Schwefelsäurequantum und eine längere Verbrennungsdauer erforderlich.

Wir haben deshalb von der Verwendung der Torsionswage für die Bestimmung des Gesamtstickstoffes im Liquor abgesehen und die zu veraschende Liquormenge mit genauen Pipetten abgemessen.

Es darf nur blutfreier Liquor verarbeitet werden, da, auch nach Entfernung der Blutkörperchen, durch die Vermischung mit dem Plasma der N-Gehalt des Liquor geändert wird. Aber auch der blutfreie Liquor wurde jedesmal vor der Verbrennung durch starkes Zentrifugieren zellfrei gemacht, da der bei verschiedenen Erkrankungen des Zentralnervensystems verschieden große Gehalt an Zellen den N-Gehalt des Liquors beeinflussen mußte. Es wurde also nur der N-Gehalt des reinen Liquor bestimmt, unabhängig von den Schwankungen welche die Beimischung zelliger Bestandteile zur Folge haben muß, und die nach den Untersuchungen von *Weinberg* u. a. auch bei normalen Fällen in den verschiedenen Portionen des Liquor auftreten sollen.

Der Liquor wurde möglichst frisch verarbeitet, um die Fehlerquellen auszuschließen, die sich aus der Verdunstung oder bakteriellen Verunreinigung ergeben. Bis zur Verbrennung wurde er in gut verschlossenen Gläsern unter Thymolzusatz im Frigo aufbewahrt.

Das Prinzip der Methode[1]) besteht darin, daß der nach Behandlung des Liquors mit Schwefelsäure und einem Katalysator gebildete Ammoniak durch heißen Wasserdampf in die Vorlage übergeführt und der Säureverlust jodometrisch bestimmt wird.

Die N-Bestimmung im Liquor nach der *Bang*schen Methode dauert nur wenige Minuten und gibt trotz Verwendung geringer Materialmengen genaue Werte. Bei der verwendeten Apparatur wird ein Verlust an N sicher vermieden, weil die zwecks Freimachung des Ammoniaks zugefügte Natronlauge in ein schon geschlossenes System eingeführt wird. Auch ist die jodometrische Bestimmung genauer als die acidimetrische. *Bang* gibt die Genauigkeit auf 0,002—0,003 mg an. Bei uns waren die Differenzen zwischen den einzelnen Bestimmungen etwas größer, bis zu 0,01 mg.

Da aber immer mehrere Parallelbestimmungen ausgeführt wurden, um von ihnen den Mittelwert zu nehmen, so wird dieser immerhin genau genug.

Mit dieser Methode wurden etwa hundert Liquoren untersucht.

Als normal wurden diejenigen Liquoren angesehen, wo weder anamnestisch noch klinisch oder serologisch-mikroskopisch ein pathologischer Befund vorlag.

---

[1]) Genaue Beschreibung der Methode zur Bestimmung von Gesamteiweiß, Globulin usw. und Apparatur bei *J. Bang*, Mikromethoden zur Blutuntersuchung. Bergmann 1920.

Einen kurzen Überblick über die erzielten Resultate geben die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Werte für den Gesamtstickstoff.

Gruppe	Diagnose des Einsenders	Pandy	WaR.	Gesamt-N pro Mille
I. Normale Liquoren	Magenbeschwerden	—	—	0,198
	Myokarditis	—	—	0,220
	Neuropathie	—	—	0,211
	Cephalea	—	—	0,216
II. Nicht-luetische Erkrankungen	Labyrinthreizung (Ohroperation)	—	—	0,1687
	Meningitis tuberkul. initial		—	0,1768
	Dieselbe, vorgeschritten	+ +	—	0,3899
	Multiple Sklerose	—	—	0,1995
	„	—	—	0,2625
	Encephalit. letharg.	—	—	0,2593
	Tumor cerebri	—	—	0,245
	„ cerebelli	—	—	0,3458
III. Luetische Erkrankungen	a) Lues latens	—	—	0,191
	„	—	—	0,272
	b) Aortit. luet.	—	—	0,247
	Aneurysma aortae	—	—	0,263
	„	—	—	0,324
	c) Lues III	—	—	0,2515
	„	—	—	0,369
	d) Lues cerebri	—	—	0,216
	„	+ +	+ + + +	0,310
	e) Tabes (Wassermann negativ)	—	—	0,190
	„	—	—	0,224
	„	+	—	0,3187
	„	+ +	—	0,3934
	Tabes (Wassermann positiv)	+	+ + + +	0,2497
	„	+ +	+ + + +	0,2597
	„	—	+	0,297
	„	—	+	0,309
	„	+	+ + + +	0,3454
	„	+	+ + + +	0,350

In den Tabellen sind außer den höheren N-Werten auch immer die niedrigsten von uns gefundenen Werte eingetragen.

Der höchste bei normalen Liquoren gefundene Wert war 0,220 p. M., der Durchschnitt 0,19—0,2, der niedrigste Wert war der von 0,17 bei „Labyrinthreizung“, vgl. Tabelle II.

Auch bei Erkrankungen des Zentralnervensystems fanden sich vereinzelt niedere N-Werte, in der bei normalen Liquoren gefundenen Breite.

Daß die Stärke der WaR. und der Globulinreaktion nicht mit der Vermehrung des Gesamt-N parallel zu gehen braucht, zeigt die Tabelle III e.

Aber es ist wohl kein Zufall, daß wir bei Wassermann-positiver Tabes nie so niedrige Werte fanden wie bei Tabes-Liquoren mit negativer WaR.

Erzielung der zweiten und dritten Vergärungsform mit Saccharomyces Saké, Zygosaccharomyces major und Zygosaccharomyces salsus.

Von

H. Kumagawa (Tokio).

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Chemische Abteilung, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 20. März 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Man verdankt *Neuberg* mit *Färber* und *Reinfurth* sowie *Neuberg* und *Hirsch* nebst *Ursum* (1916—1920) die Feststellung an, daß unter dem Einflusse bestimmter alkalisch reagierender Stoffe — wie der sekundären Alkalisulfite und anderer basischer Körper — Abartungen der alkoholischen Gärung erfolgen. Bei der Umsetzung gärfähiger Zucker in Gegenwart schwefligsaurer Salze treten bedeutende Mengen Acetaldehyd und Glycerin, und zwar in molekularer Proportion auf. Der Zerfall der Hexosen vollzieht sich dabei gemäß der Gleichung:

$$C_6H_{12}O_6 = CO_2 + CH_3 \cdot CHO + C_3H_8O_3.$$

Diese Form der Umsetzung haben *Neuberg* und *Reinfurth* im Gegensatz zur gewöhnlichen Gärung, die Kohlendioxyd und Weingeist liefert, die zweite Vergärungsform genannt. Die übrigen alkalisch reagierenden Verbindungen anorganischer und organischer Natur rufen eine neue Veränderung des Gärungsverlaufs hervor. Hierbei entsteht nur vorübergehend Acetaldehyd, und in den Gärerzeugnissen finden sich die Dismutationsprodukte des Acetaldehyds, nämlich Essigsäure und Äthylalkohol. Diese als dritte Vergärungsform bezeichnete Art der Zuckerspaltung vollzieht sich in ihren stöchiometrischen Verhältnissen gemäß folgender Formulierung:

$$2\ C_6H_{12}O_6 + H_2O = CH_3 \cdot COOH + C_2H_5OH + 2\ CO_2 + 2\ C_3H_8O_3.$$

Die skizzierten Ergebnisse haben *Neuberg* und seine Mitarbeiter mit deutschen Hefen gewonnen, und zwar mit obergärigen Sorten wie mit untergärigen Rassen. Sie haben ausgeführt, warum keine Abänderung

des Gärungsverlaufs nach der zweiten oder dritten Vergärungsform zu 100% bislang zu erzielen war; denn einerseits machen sich unverkennbar Dissoziationsvorgänge[1]) geltend, und andererseits ist es unmöglich, einen Überschuß der erwähnten Alkalisatoren in genügender Konzentration ohne Schaden für die Hefen den Maischen zuzusetzen. Aber immerhin gelangten *Neuberg* und *Reinfurth*[2]) zu jener Acetaldehyd-Glycerin-Spaltung des Zuckers in einer Ausbeute von schließlich 74,2% der theoretischen Möglichkeit, und *Neuberg* und *Ursum* konnten die dritte Vergärungsform in Gegenwart von Ammoniumcarbonat bis zu einem Umfange von 41,3% und bei Kaliumphosphat zu 30,5% herbeiführen.

Es war nun der Versuch von Interesse, mit anderen Heferassen zu arbeiten und folgendes zu prüfen:

a) *Wirken ausländische Hefesorten wie beispielsweise die in der Überschrift genannten japanischen Rassen ebenso wie die deutschen Hefen?*

b) *Gelingt es, mit diesen andersartigen Erregern jene Abartungen des Gärungsvorgangs unter dem Einfluß der genannten Hilfsmittel noch weiter zu treiben?*

Beide Fragen sind zu bejahen.

Die japanischen Hefen verhalten sich den deutschen vollkommen entsprechend. Eine derselben, nämlich die *Saké-Hefe, verträgt mehr Sulfit.* Daher ist es — *in Bestätigung der von Neuberg* und *Reinfurth gegebenen Begründungen* — *gelungen, die Ausbeuten noch weiter zu steigern.* Sie erstrecken sich jetzt bis 19,65% Acetaldehyd und 39,18% Glycerin für 100 g Hexose; die entstehende Alkoholmenge beläuft sich in diesem Falle nur noch auf 10,12% (gegen rund 50% der Norm!). Die Gesamtumsetzung des Zuckers beträgt 98,28% der angewendeten Menge, und die zweite Vergärungsform ist nun zu 80,25% verwirklicht worden.

Zu bemerken ist noch, daß alle diese sowie die nachstehend beschriebenen Versuche mit *absoluten Reinzuchthefen* unter Bedingungen ausgeführt worden sind, die eine nachträgliche Infektion ausschlossen.

Damit ist von neuem bewiesen, daß die Acetaldehyd-Glycerin-Spaltung als eine selbständige Form der Zuckerzerlegung anzusehen ist und daß sie in ganz besonders hohem Umfange eintreten kann. Sollte man eine Hefe finden, die noch stärkere Zusätze von sekundärem schwefligsaurem Salz verträgt, so wird man wohl die zweite Vergärungsform sogar in einem Ausmaße von praktisch 100% zu erreichen imstande sein.

Weiterhin wurden analoge Experimente mit dem *Zygosaccharomyces salsus* sowie dem *Zygosaccharomyces major* vorgenommen. Es sind dies zwei Hefen, welche aus der Soja-Sauce gezüchtet und an den

---

[1]) Die Sulfite lagern sich an den Acetaldehyd zu den bekannten zerlegbaren Additionsverbindungen an.

[2]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, B. 52, 1696. 1919.

Gärungsvorgängen stark beteiligt sind, die sich bei der Erzeugung jenes Genußmittels abspielen. Man hätte erwarten können, daß gerade diese Hefearten auch bei starken Mineralstoffzugaben — bekanntlich geschieht die Herstellung der Soja-Sauce in Gegenwart von viel Kochsalz — besonderes leisten würden. Die Voraussetzung hat sich jedoch nicht erfüllt, indem beide Zygosaccharomyceten hinter der Sakéhefe in ihrem Wirkungsgrade zurückblieben; es liegt dies allem Anschein nach daran, daß die zuckervergärende Kraft der beiden Zygosaccharomyceten an sich viel schwächer ausgebildet ist als die von Sakéhefe.

Über die in der erwähnten Richtung gewonnenen Resultate geben die nachfolgend erwähnten Versuchsprotokolle sowie die graphische Darstellung der Befunde mit Sakéhefe Auskunft.

Weiter ist alsdann die japanische *Sakéhefe* hinsichtlich ihrer Eignung *zur Erzielung der dritten Vergärungsform* herangezogen worden. (Die beiden anderen Erreger wurden wegen ihrer erwähnten geringen Vergärungskraft nicht eingehender geprüft.) Die Untersuchung wurde auf die Umsetzung des Zuckers in Gegenwart sowohl von Ammoniumbicarbonat als von Dikaliumphosphat beschränkt. Die Resultate waren — das weisen die nachstehenden Versuchsprotokolle aus — etwa die gleichen wie mit den deutschen Hefen. Nur für Kaliumphosphat gelangte ich zu etwas höheren Werten, und zwar ebenfalls wegen größerer Toleranz des japanischen Pilzes gegenüber diesem Salz.

Hervorheben möchte ich, daß *die Vergärung durch Sakéhefe in Gegenwart von Dikaliumphosphat eine Verminderung der normalen Alkoholausbeute, aber dafür eine beträchtliche Bildung von Essigsäure und Glycerin nach sich zog*[1]). Mir scheint dieses Ergebnis insofern von Wichtigkeit, als im Gegensatz zu manchen anderen Annahmen die Zuckerumsetzung in Gegenwart von Kaliumphosphat gar nicht den normalen Verlauf nimmt, sondern dieses Salz genau wie andere Mineralstoffe basischen Charakters die Vollziehung der dritten Vergärungsform bewerkstelligt. Die Alkoholausbeute sinkt erheblich, unter entsprechendem Anwachsen von Essigsäure und Glycerin. Es erscheint also der Zweifel berechtigt, ob Vergärungen in Gegenwart von Phosphat überhaupt den gewöhnlichen Typus der einfachen alkoholischen Zuckerspaltung wiedergeben.

Belege.

Für die analytische Ermittlung der Reaktionsprodukte, wie sie bei der zweiten und dritten Vergärungsform auftreten, habe ich mich stets der von *Neuberg* und seinen Mitarbeitern ausgearbeiteten Methodik bedient und verfuhr wie folgt:

---

[1]) Vgl. hierzu bereits *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **100**, 318. 1919. — *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **103**, 333. 1920. — *C. Neuberg* und *W. Ursum*, diese Zeitschr. **110**, 198. 1920.

A. Quantitative Bestimmung des Acetaldehyds im Gärgut nach dem Destillations-Titrations-Verfahren [1]).

Im Gärgut findet sich der abgefangene Acetaldehyd nicht frei vor, sondern in Form des Aldehyd-Sulfit-Komplexes. Er kann nicht ohne weiteres quantitativ aus dieser Verbindung abdestilliert werden, sondern es ist erforderlich, die Aldehyd-Sulfit-Verbindung vorher chemisch zu zerlegen. Man fügt zum Gärgut eine dem angewandten Sulfit entsprechende Menge Chlorbariumlösung, nachdem zuvor die Flüssigkeiten stark abgekühlt waren. Sofort fällt das Bariumsulfit (neben $BaSO_4$) aus und wird durch ein trockenes Filter abgetrennt. Die Filtration muß im Eisschrank vorgenommen werden wegen der beginnenden Dissoziation des aldehyd-schwefligsauren Salzes. Das Filtrat wird der Destillation mit Wasserdampf unterworfen unter Zusatz von $CaCO_3$ ($^2/_3$ vom Gewicht des ursprünglich angewendeten Zuckers); der kohlensaure Kalk bewirkt vollständige Zerlegung des Schwefligsäure-esters, ohne den Aldehyd anzugreifen. Dieser geht mit dem Wasserdampf in eine Vorlage über, die mit 20 ccm 50 proz. reinem, aldehydfreiem Alkohol beschickt ist und mit Eis umgeben wird; zur Sicherheit schließt man an sie noch eine ebenso hergerichtete Vorlage an. Die abdestillierende aldehydhaltige Flüssigkeit muß sehr kalt gehalten werden, am besten durch ein Metallkühlersystem. Nach einer Destillationszeit von etwa 20 Minuten prüft man dann an der Verbindungsstelle von Kühlerrohr mit der ersten Vorlage durch Auffangen von 2 ccm Destillat an Hand der Nitroprussidnatriumprobe, ob aller Acetaldehyd abgetrieben ist. Das ist in der Regel nach dieser Zeit der Fall. Die Destillation wird abgebrochen und der Inhalt der beiden Vorlagen quantitativ in einen Meßzylinder mit Stopfen gespült. In einem aliquoten Teil wird nunmehr der Acetaldehyd jodometrisch ermittelt.

B. Alkoholbestimmung.

Die Gegenwart der beträchtlichen Aldehydmenge im Gärgut erfordert eine Alkohol-Bestimmungsmethode, die sich nicht auf eine einfache Destillation und anschließende Anreicherung des Destillates beschränken darf. Denn mit den Alkohol und Wasserdämpfen verflüchtigt sich auch Acetaldehyd und muß aus dem Destillat entfernt werden. *Neuberg* und *Hirsch* haben festgestellt, daß überschüssiges m-Phenylendiamin-chlorhydrat selbst größere Mengen Acetaldehyd vollständig bindet. Der für die Aldehyd-Beseitigung erforderliche Überschuß an m-Phenylendiamin-chlorhydrat wird so bemessen, daß er etwa die 3fache Gewichtsmenge der salzsauren Base auf einen Teil maximal vorhandenen Aldehyds beträgt. (Der Aldehydgehalt des Gärguts ist durch die voraufgegangene, besonders vorgenommene Aldehydanalyse bereits bekannt.) Die Ausführung der Alkoholbestimmung gestaltet sich sehr bequem derart, daß zunächst aus einem Teil des vorliegenden Gärguts $^2/_3$ des Volumens abdestilliert werden und das Destillat dann mit der erforderlichen Menge des HCl-Diamins in der Kälte versetzt wird. Nach $^1/_2$stündigem Stehen wird darauf die Flüssigkeit eine Stunde lang am Energierückflußkühler gekocht und nachher daraus der Alkohol unter ausreichender Kühlung in eine Vorlage getrieben. Sollte das Übergegangene etwas trübe aussehen, so wird es bei der folgenden Destillation mit wenig Knochenkohle zusammen abdestilliert. Man muß darauf achten, daß die Destillate neutral reagieren; sollten sie schwach alkalisch oder sauer sein, so behebt man das damit, daß man bei den fortlaufenden anreichernden Destillationen, je nach Bedarf, mit wenig H_2SO_4 oder NaOH zusammen abdestilliert. Man verfährt bei der Destillation stets so, daß man $^2/_3$ des Volumens aus dem Destillationskolben übertreibt. In dem Enddestillat wird sodann pyknometrisch der Alkoholgehalt festgestellt.

[1]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **89**, 390 u. ff. 1918.

C. Die Glycerinbestimmung

erfolgt am exaktesten nach der Isopropyljodid-Methode. Hierbei können organische und mineralische Beimengungen, namentlich Schwefelverbindungen, erheblich stören. Man muß deshalb eine Reinigung einschalten, bezüglich deren Ausführung auf die genauen Vorschriften von *Neuberg* und *Reinfurth* (l. c.) verwiesen sei.

Experimentelle Daten.

A. Vergärungen nach der 2. Vergärungsform.

I. Versuche mit Saccharomyces Saké.

a) Die sterile Lösung von 60 g Rohrzucker in 300 ccm H_2O wurde mit 6 g rein gezüchteter Sakéhefe, 0,6 g Ammoniumsulfat, 0,1 g Dinatriumphosphat, sowie mit Spuren Magnesiumsulfat, Calciumchlorid nebst Kaliumchlorid versetzt und in den Brutschrank bei 35° gerade bis zur beginnenden lebhaften Gärung gestellt. Alsdann wurde die 30 g wasserfreiem Na_2SO_3 entsprechende Menge[1]) von analysiertem, wasserhaltigem Dinatriumsulfit, die in ca. 300 ccm keimfreiem Wasser gelöst waren, dazugegeben und nach tüchtigem Umschütteln das Gärgut erneut in den Brutschrank gebracht. Das Gemisch wurde täglich mehrmals aufgerührt. Um die Gärung zu beschleunigen, wurden nach 3 Tagen weitere 6 g Sakéhefe zugefügt; das Gärgut blieb noch 2 Tage lang im Brutschrank. Alsdann war aller Zucker verschwunden.

Die Gesamtmenge des Gärguts machte 600 ccm aus; in je 150 ccm wurde die Acetaldehyd-, Alkohol- und Glycerinbestimmung vorgenommen.

Die *Acetaldehyd-Analyse* ergab 2,31 g Acetaldehyd = 14,62% der zugrunde liegenden Hexosen.

Bei der *Alkoholbestimmung* wurden 2,92 g = 18,48% (auf Monosaccharide bezogen) ermittelt.

An *Glycerin* wurden 4,475 g = 28,33% gefunden.

Aus der Summe von Acetaldehyd, Alkohol und Glycerin, die sich auf 61,43% beläuft, errechnet[2]) sich die Kohlensäuremenge (gemäß den Gleichungen für die zweite und erste Vergärungsform) zu 32,29%, so daß die Gesamtsumme der Zuckerumsetzungsprodukte 93,72% ausmacht. Die restlichen 6,28% sind auf das Konto nicht vermeidlicher Versuchsfehler bzw. anderweitigen Zuckerverbrauches zu setzen.

b) Angewendet wurden 60 g Rohrzucker, 6 g Sakéhefe, 0,6 g Ammoniumsulfat, 0,1 g Dinatriumphosphat, Spuren Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Kaliumchlorid in 300 ccm Wasser. Die Ausführung des Versuchs war die gleiche wie im vorher beschriebenen Ansatz. Nur wurden diesmal nach dem Angären 45 g Natriumsulfit, in 300 ccm Wasser gelöst, dazugetan; das Gemisch wurde wieder in den Brutschrank gestellt.

[1]) Das gleiche gilt auch für alle folgenden Versuche.

[2]) Tatsächliche Bestimmungen von CO_2, die wegen der gleichzeitigen Anwesenheit von $NaHCO_3$ und schwefligsaurem Salz umständlich sind, haben früher *Neuberg*, *Hirsch* und *Reinfurth* (diese Zeitschr. **105**, 307. 1920) ausgeführt.

Nach 3 Tagen habe ich weitere 6 g der Hefe zugesetzt und nach Verlauf von abermals 2 Tagen das Gärgut zu den Analysen verwendet.

Gefunden wurden für 15 g Rohrzucker = 15,8 g Hexosen:

2,54 g Acetaldehyd .	= 16,08% [1]	
2,53 „ Alkohol	= 16,01 „	
5,29 „ Glycerin . . .	= 33,48 „	
Aus diesen	65,57%	
	+ 31,39 „	CO_2
ergaben sich . . .	96,96%	Gärungsprodukte.

c) Die Mengenverhältnisse waren die gleichen wie bei a), nur daß statt 30 g sek. Natriumsulfit 60 g in Anwendung gebracht wurden. Nach 2tägiger Digestion im Brutschrank wurden erneut 6 g der Spezialhefe hinzugefügt.

Die Untersuchung wies für 150 ccm Gärgut nach weiteren 5 Tagen aus:

2,67 g Acetaldehyd	= 16,89%	
2,23 „ Alkohol	= 14,11 „	
5,40 „ Glycerin	= 34,17 „	
Aus der Gesamtsumme von	65,17%	
	+ 30,38 „	CO_2
findet man	95,55%	Umsetzungsprodukte.

d) Versuchsanordnung wie zu a), doch statt 30 g sek. schwefligsaurem Salz 75 g. Am 2. und 5. Tage wurden noch 6 g Hefe hinzugetan. Nach Verlauf weiterer 5 Tage wurden für 15 g angewendeten Rohrzucker (= 15,8 g Hexosen) ermittelt:

2,80 g Acetaldehyd . .	= 17,72%	
1,95 g Alkohol	= 12,34 „	
5,67 g Glycerin . . .	= 35,88 „	
	65,94%	
	+ 29,52 „	CO_2
	= 95,46%	Gesamtumsetzungsprodukte.

e) 60 g Rohrzucker, 6 g Sakéhefe, 0,4 g Ammoniumsulfat, 0,15 g Natriumphosphat, je 2 Tropfen Magnesiumsulfat- und Calciumchloridlösung sowie eine Spur Kaliumchlorid befanden sich in 300 ccm H_2O. Sofort nach Eintritt der Gärung wurden 90 g Natriumsulfit, in 300 ccm H_2O, hinzugefügt. In Abständen von je 5 Tagen wurde noch 3 mal je 6 g Sakéhefe nachgegeben. Nach insgesamt 20 Tagen wurden die verschiedenen Bestimmungen ausgeführt.

Sie lieferten für je 150 ccm Gärgut:

3,10 g Acetaldehyd .	= 19,65%	
1,60 „ Alkohol	= 10,12 „	
6,19 „ Glycerin . . .	= 39,18 „	
	68,95%	
	+ 29,33 „	CO_2
insgesamt	98,28%	Reaktionsprodukte.

[1]) Die Prozentzahlen beziehen sich hier und im folgenden auf die Menge der zugrunde liegenden Hexosen.

Hier ist, wie S. 149 schon hervorgehoben, die Umsetzung nach der zweiten Vergärungsform zu 80,3% bzw. 80,2%, berechnet aus der gefundenen Menge Acetaldehyd oder Äthylalkohol, erzwungen worden. Die Übereinstimmung ist vorzüglich. Sie folgt nämlich aus den Daten für 2 ganz ungleich entstehende und verschieden ermittelte Produkte; weniger zuverlässig erscheint eine Beziehung auf Glycerin, da dessen Analyse leicht mit Verlusten verbunden ist. Angenommen wird der Durchschnittswert 80,25%.

II. Versuche mit Zygosaccharomyceten.

α) *Zygosaccharomyces major.*

a) 45 g Rohrzucker, 0,45 g Ammoniumsulfat, 0,23 g Natriumphosphat, Spuren Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Kaliumchlorid wurden in 225 ccm Wasser gelöst. Nach Beginn der Gärung, die mit 4,5 g des Erregers eingeleitet war, wurden unverzüglich 22,5 g Natriumsulfit in 225 ccm Wasser dem Gärgut zugefügt. Nach 5 Tagen wurden weitere 4,5 g Saccharomyces major und nach nochmals 5 Tagen erneut 2,5 g des Pilzes hinzugegeben. Die Gärung ging sehr langsam vor sich. Nach einem Monat war noch viel unvergorener Zucker im Gärgut enthalten, doch wurde jetzt die Bestimmung der typischen Gärungsprodukte vorgenommen. Berechnet auf 15 g Rohrzucker = 15,8 g Hexose wurden gefunden:

0,33 g Acetaldehyd . . . = 2,09%
0,69 g Glycerin . . . . . = 4,38 „

b) Wegen der mäßigen Ausbeuten, die der vorige, mit Rohrzucker ausgeführte Versuch geliefert hatte, wurden diesmal 45 g Traubenzucker verwendet; die Menge der gewöhnlichen Salze nebst Hefe war die gleiche wie vorher, nur kamen statt 22,5 g Natriumsulfit 33,75 g in Anwendung. Nach 5tägigem Stehen wurden von neuem 2,25 g Zygosaccharomyces major und nach weiteren 4 Tagen eben so viel vom selben Erreger zugesetzt. Nachdem 9 Tage verstrichen waren, wurde die Bestimmung des Acetaldehyds sowie Glycerins ausgeführt. Es wurden auf 15 g Traubenzucker erhalten:

1,76 g Acetaldehyd . . . = 11,74%
3,56 g Glycerin . . . . = 23,73 „

Aus dem Rückstande von der Dampfdestillation, der bei der Ermittlung des Acetaldehydgehaltes übrigblieb, wurde die unvergorene Glucose nach der Zuckerbestimmungsmethode von *Pavy-Kumagawa-Suto* angenähert ermittelt. Danach waren von 45 g Hexose noch 7,86 g = 17,47% vorhanden.

β) *Zygosaccharomyces salsus.*

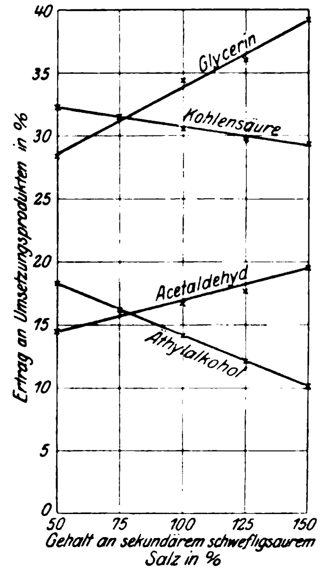
60 g Rohrzucker, 6 g Zygosaccharomyces salsus nebst den Salzen in 300 ccm H_2O. Zugabe von 30 g Na_2SO_3 in 300 ccm H_2O. Temperatur 28°. Nach jeweils 5 Tagen wurde Hefe nachgegeben und zwar die beiden

ersten Male 6 g, später 4 g Zygosaccharomyces salsus. Nach 20 Tagen wurde zur Bestimmung der Gärungsprodukte geschritten, obschon nicht aller Zucker umgesetzt war. Es wurden auf 15,8 g ursprünglich vorhandenem Invertzucker erhalten:

0,58 g Acetaldehyd . . . = 3,67%
1,29 „ Alkohol . . . . . = 8,16 „
1,37 „ Glycerin . . . . = 8,66 „

B. Vergärungen nach der 3. Vergärungsform.

a) Das Gärgemisch hatte ein Volumen von 400 ccm, enthaltend 40 g Rohrzucker, 20 g Sakéhefe, 0,2 g Dikaliumphosphat und 24 g *Ammoniumbicarbonat* (Ammoniakgehalt 21,5%); es wurde 3 Tage bei 35° im Brutschrank belassen. Der Zucker war beinahe verbraucht; die *Fehling*sche und *Ost*sche Probe ergaben, auch nach Entfernung von NH_3, ein mäßig positives Resultat. Die Bestimmungen des Essigsäure- und des Glyceringehaltes habe ich nach den Vorschriften von *Neuberg* und *Hirsch* ausgeführt.



Graphische Übersicht über die Ausbeuten an Produkten der zweiten Vergärungsform und über die Abhängigkeit der Erträge vom Gehalt an sekundärem schwefligsauren Salz.

Folgende Mengen wurden für 100 ccm Gärgut erhalten:

0,54 g Essigsäure . . . = 5,12%
1,64 „ Glycerin . . . . = 15,57 „

b) Zur Anwendung gelangten in 400 ccm Maische 40 g Rohrzucker, 40 g Sakéhefe, 0,4 g Ammoniumsulfat, 104,8 g *Dikaliumphosphat* (Lösung = 1,5 m) und je 4 Tropfen Magnesiumsulfat- und Calciumchloridlösung. Nach 3 Tagen wurden dann gefunden für 100 ccm Gärgut, anfangs enthaltend 10,53 g Hexose:

0,61 g Essigsäure . . . = 5,78%
1,82 „ Glycerin . . . . = 17,30 „

In diesem *Phosphat-ansatz* glückte eine Erzielung der *dritten Vergärungsart* zu 33,8 bzw. 34,7%.

Zusammenfassung.

Die japanischen Hefen Saccharomyces Saké, Zygosaccharomyces major und Zygosaccharomyces salsus sind imstande, genau wie die deutschen Hefen die Umsetzung des Zuckers nach der zweiten und dritten Vergärungsform herbeizuführen.

Der besonders wiederstandsfähige Erreger *Saccharomyces Saké* verträgt eine höhere Zugabe von sekundärem schwefligsauren Natrium als die früher geprüften deutschen Rassen. Demgemäß ist — ent-

sprechend den von *Neuberg* und *Reinfurth* gemachten Beobachtungen und daraus von ihnen gezogenen Schlußfolgerungen — der Umfang, in dem die Acetaldehyd-Glycerin-Spaltung des Zuckers eintritt, besonders groß. Die erzielten Ausbeuten betragen bis 19,65% an Acetaldehyd und 39,18% an Glycerin, während der Alkoholertrag auf 10,12% zurückging. Der Zucker wurde auch unter diesen extremen Bedingungen vollständig verbraucht; 98,28% desselben sind in Form der erwähnten Reaktionsprodukte sowie des noch hinzutretenden Kohlendioxyds wiedergefunden. 80,25% der Theorie sind nach der *zweiten Vergärungsform* umgesetzt.

Die beiden geprüften japanischen *Zygosaccharomyceten* erwiesen sich als den deutschen Kulturhefen nicht überlegen in bezug auf die Fähigkeit, die zweite Vergärungsform zu vollziehen. Es liegt dies daran, daß die beiden Zygosaccharomyceten an sich nur schwach Zucker spalteten und viel davon unangegriffen ließen.

Was die Verwirklichung der *dritten Vergärungsform* anlangt, so erwies sich der Saccharomyces Saké gleich den deutschen Hefen dazu befähigt. Der Umfang, in dem die Zerlegung des Zuckers in Essigsäure und Glycerin erfolgte, war teilweise auch etwas größer, da mehr Alkalisator zur Anwendung kommen konnte.

Über die Zerlegung des meso-Inosits und Glycerins nach Art der wahren Zucker durch den Bacillus lactis aerogenes.

Von

H. Kumagawa (Tokio).

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Chemische Abteilung, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 20. März 1922.)

Früher hat man den natürlichen *Inosit* wegen seiner Bruttozusammensetzung $C_6H_{12}O_6$ den Zuckerarten an die Seite gestellt, obgleich schon lange seine Zugehörigkeit zur hydroaromatischen Reihe bekannt ist. Inosit ist ein cyclischer Körper und hat die Konstitution eines optisch inaktiven Hexaoxy-hexa-hydrobenzols, eine Anschauung, die vor nicht allzu langer Zeit durch eine wichtige Synthese dieser Inositform vom Hexaoxybenzol aus bestätigt werden konnte [1]).

Immerhin lassen Formel und Struktur die Möglichkeit offen, daß in der Natur der Inosit aus den Hexosen durch einen einfachen Ringschluß (intramolekulare Aldolbildung) und nicht auf kompliziertem Wege aus Benzolderivaten hervorgeht, und es fehlt auch nicht an Reaktionen, die den Inosit mit den wahren Zuckerarten verknüpfen. Im Jahre 1908 zeigte *Neuberg* [2]), daß man mit rein chemischer Methodik aus Inosit Furfurol erhalten kann, das als ein typisches Spaltungsprodukt der gewöhnlichen Kohlenhydrate seit jeher gilt. Auch biochemische Beziehungen sind bekannt. So haben *Hilger* [3]) und *Vohl* [4]) angegeben, daß bei der Fäulnis des Inosits Milchsäure sowie Propionsäure und Buttersäure auftreten, und *Paul Mayer* [5]) konnte bei der Verfütterung von Inosit neben unverändertem Ausgangsmaterial aus dem Harn *d, l-Milchsäure* isolieren. Über die Beziehungen zum Zuckerstoffwechsel geben bedeutsame neue Experimente von *Greenwald* und *Weiß* [6]) Auskunft, die beim Phlorizindiabetes des Hundes im Jahre 1917 einen bemerkenswerten Übergang von Inosit in Traubenzucker sicherge-

[1]) *H. Wieland* und *R. S. Wishart*, B. **47**, 2082. 1914.
[2]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **9**, 551. 1908.
[3]) *Hilger*, Ann. **160**, 333. 1871.
[4]) *H. Vohl*, B. **9**, 984. 1876.
[5]) *P. Mayer*, diese Zeitschr. **9**, 533. 1908.
[6]) *J. Greenwald* und *M. L. Weiß*, Journ. of biol. chem. **31**, 1. 1917.

stellt haben, während früher *Embden, Kalberlah* und *Engel*[1]) mit einfachem Muskelpreßsaft keine Milchsäurebildung aus Inosit haben erzielen können.

Die alten Untersuchungen über die Fäulnis des Inosits sind mit Mischkulturen und Erregern unbekannter Natur ausgeführt gewesen. Ich verwendete für meine Versuche den *Bacillus lactis aerogenes* und ließ diesen Mikroorganismus in Inositlösungen wachsen, die außer Mineralstoffen als Stickstoffquelle teils Ammoniumsulfat, teils Pepton enthielten. Um gleichzeitig zu erkunden, ob der Abbau des Inosits über die nunmehr durch die Arbeiten *Neubergs* und seiner Schule ergründete Stufe des Acetaldehyds[2]) vor sich geht, habe ich meine Experimente derartig angeordnet, daß sie *Abfangversuche* darstellen. Dabei bediente ich mich des neutralen *Calciumsulfits*, das *Neuberg, Nord* und *Wolff*[3]) bei der Spaltung der Glucose ebenfalls durch Bacillus lactis aerogenes mit Erfolg benutzt haben. Da es mir nur darauf ankam, in den Mechanismus des Inositabbaus einen Einblick zu tun, habe ich nicht auf alle möglichen Reaktionsprodukte geachtet, sondern mich auf Behandlung der Frage beschränkt, ob — außer den entwickelten Gasen — Acetaldehyd, Milchsäure und Bernsteinsäure in Erscheinung treten. Aus den nachfolgenden Versuchsprotokollen geht hervor, daß dies ausnahmslos der Fall gewesen ist. *Der Abbau der Cyclose Inosit vollzieht sich unter der Einwirkung des Bacillus lactis aerogenes grundsätzlich also ähnlich wie der von Zuckern mit offener Kette.*

Während der Niederschrift meiner Arbeit erhielt ich Kenntnis von einer beachtenswerten Mitteilung von *J. A. Hewitt* und *D. B. Steabben*[4]). Diese Autoren haben noch Ameisensäure, Alkohol und Essigsäure gefunden, aber den Acetaldehyd nicht angetroffen. Gerade das Auftreten des letzteren scheint mir aber von besonderer Bedeutung hinsichtlich der Frage nach dem *Mechanismus des Inositabbaus*; und wenn von den englischen Autoren Alkohol und Essigsäure ermittelt worden sind, so darf man gerade diese Körper aus intermediär gebildetem Acetaldehyd gemäß allen neueren Erfahrungen[5]) herleiten. Daß ich den Acetaldehyd niemals vermißt habe und ihn in meinen Ansätzen sogar in ziemlichen Mengen isolieren konnte, führe ich auf Differenzen in der Kultur zurück. Es ist nämlich bekannt, daß es nicht nur Variationen des Bacillus lactis aerogenes gibt, sondern daß sich die Stämme auch in ihrer Empfind-

---

[1]) *G. Embden, Fr. Kalberlah* und *H. Engel*, diese Zeitschr. **45**, 58. 1912.

[2]) *C. Neuberg* und *E. Färber*, diese Zeitschr. **78**, 238. 1916; *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **89**, 365. 1918 und folgende Jahre. Vergl. auch *W. H. Peterson* und *E. B. Freds* interessante Ergebnisse mit den Pentosen vorgärenden Bakterien, Journ. of biolog. Chem. **44**, 29. 1920.

[3]) *C. Neuberg, F. F. Nord* und *E. Wolff*, diese Zeitschr. **112**, 144. 1920.

[4]) *J. A. Hewitt* und *D. B. Steabben*, Biochem. Journ. **15**, 665. 1921.

[5]) Vgl. *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **100**, 304. 1919; *C. Neuberg* und *W. Ursum*, diese Zeitschr. **110**, 193. 1920.

lichkeit gegen Zusätze unterscheiden, namentlich aber weiß man, daß längere Zeit im Laboratorium überimpfte Erreger sich anders als frisch gezüchtete Kleinlebewesen verhalten.

Während der Inosit als ein sechswertiger Alkohol zu betrachten ist, liegt in dem wichtigen Naturprodukt *Glycerin* ein dreiwertiger Alkohol vor. Da man annehmen muß, daß unter natürlichen Bedingungen der Bacillus lactis aerogenes auch mit dem Glycerin in Berührung kommt, habe ich dessen Umsetzung gleichfalls geprüft und mich vergewissert, daß die Reaktionsprodukte in qualitativer Hinsicht die gleichen sind; denn es traten ebenfalls Milchsäure, Bernsteinsäure und nicht unbedeutende Mengen Acetaldehyd auf, sobald man als Abfangmittel für den letzteren neutrales Calciumsulfit zugefügt hatte.

Die Güte und Eignung der Kultur, die von Herrn Prof. *Ficker* stammte, habe ich in allen Fällen durch das Verhalten des Erregers gegenüber Traubenzucker kontrolliert, wobei ich die Ergebnisse von *Neuberg*, *Nord* und *Wolff*[1]) bestätigen kann. Die Einzelheiten sowie die befolgte Arbeitsweise schildere ich in der nachstehenden Auswahl der Versuche.

A. Ansätze mit Inosit.

Versuch a.

Ein steriler Gärkolben von 400 ccm wurde mit einer Lösung von 2,0 g Inosit, 1,0 g Pepton (Witte), 0,5 g Kochsalz und 1,0 g Calciumcarbonat in 100 ccm Wasser beschickt und mit 4 g frisch bereitetem Calciumsulfit (50% Gehalt an $CaSO_3$) versetzt. Sodann wurde der Kolben an 3 aufeinanderfolgenden Tagen im *Koch*schen Dampftopf je 30 Minuten lang sterilisiert, darauf das Gemisch mittels einer Platinöse mit dem Bacillus lactis aerogenes beimpft und im Brutschrank bei 37° belassen. Das Gemenge wurde täglich mehrmals gut durchgeschüttelt. Nach einigen Stunden schon trat Gasentwicklung ein. Nach 2 Tagen konnte mikroskopisch in einigen Tropfen lebhaftes Wachstum des Bacillus festgestellt werden; die Nitroprussidnatrium-reaktion fiel mit 1 ccm Lösung positiv aus. Nach abermals 2 Tagen war die Acetaldehydreaktion noch stärker, auch das Vorhandensein von Milchsäure ließ sich nachweisen. Nach Ablauf von 12 Tagen hörte die Gasentwicklung auf, und eine Probe auf Inosit nach *Scherer* und *Salkowski* lehrte, daß aller Inosit umgesetzt war. Das Gärgut wurde nunmehr quantitativ auf Acetaldehyd nach dem Verfahren von *Neuberg* und *Reinfurth* (l. c.) analysiert. Es ergab sich insgesamt ein Gehalt von 0,128 g Acetaldehyd = 6,4% (berechnet auf die angewendete Inositmenge).

Der nach der Acetaldehyd-destillation verbleibende Rückstand wurde konzentriert, filtriert, mit Schwefelsäure angesäuert und 2 Tage lang mit Äther extrahiert. In dem ersten sirupösen Ätherauszug (ungefähr 0,4 g)

[1]) l. c.

zeigte die Reaktion von *Hopkins* und *Fletcher* ein Vorhandensein von Milchsäure an. Nach einiger Zeit schieden sich Kristalle ab, die auf Ton abgepreßt und mit wenig kaltem Wasser gewaschen wurden. Mit dieser rein weißen Substanz fiel die Probe auf Bernsteinsäure nach der Methode von *Neuberg*[1]) positiv aus.

Versuch b.

Zur Kontrolle setzte ich auch einen Versuch ohne Inosit an, der unter den gleichen Bedingungen wie der vorige ausgeführt wurde. Eine Bildung von Acetaldehyd war jedoch nicht erweislich.

Versuch c.

In 100 ccm Wasser waren enthalten 2 g Inosit, 1 g Pepton (Witte), 2 g Calciumcarbonat und 4 g Calciumsulfit. Die Verhältnisse waren sonst ebenso wie bei Versuch a. Nach einer Woche offenbarte eine Prüfung ziemliche Mengen an Acetaldehyd und Milchsäure, obgleich noch nicht aller Inosit vergoren war. Trotzdem wurden 50 ccm des Gärgutes aufgearbeitet. Gefunden wurden jetzt 0,062 g Acetaldehyd = 6,20%. Nach abermals einer Woche wurde der Rest (40 ccm) verarbeitet. Der Acetaldehydgehalt belief sich nur noch auf 0,040 g = 5,00%.

Versuch d.

Hier wurde das Pepton durch eine anorganische Nährlösung ersetzt. Zur Anwendung gelangten auf 100 ccm 2 g Inosit, 1 g Ammoniumsulfat, 0,2 g Dikaliumphosphat, 0,02 g Magnesiumsulfat, 2,0 g Calciumcarbonat sowie 4 g Calciumsulfit. Nach 7 Tagen wurde die Acetaldehydbestimmung in 50 ccm vorgenommen. Ermittelt wurden 0,0499 g = 4,99%.

Nach einer weiteren Woche wurden in dem Rest (40 ccm) 0,0353 g = 4,41% Acetaldehyd festgestellt.

B. Ansätze mit Glycerin.

Versuch e.

200 ccm enthielten z. B. 4,0 g Glycerin, 2 g Ammoniumsulfat, 0,4 g Dikaliumphosphat, 0,04 g Magnesiumsulfat, 4 g Calciumcarbonat und 8 g Calciumsulfit. Die nach 5 Tagen ausgeführte Acetaldehydanalyse ergab in 50 ccm Gärgut 0,0496 g Acetaldehyd = 4,96%.

C. Vergleichsversuch mit Glucose.

Versuch f.

Die 200 ccm betragende Flüssigkeit hatte folgende Zusammensetzung: 4 g Traubenzucker, 2 g Ammoniumsulfat, 0,4 g Dikaliumphosphat, 0,04 g Magnesiumsulfat, 4 g Calciumcarbonat und 8 g schwefligsaures Calcium. Nach 5 Tagen erfolgte die Acetaldehydbestimmung; sie lieferte 0,0475 g Acetaldehyd in 50 ccm = 4,75%.

[1]) *C. Neuberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 574. 1900.

Zur Kenntnis der Phosphatasen.

I. Mitteilung.

Saccharo-phosphatase.

Von

M. Tomita.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Chemische Abteilung, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 22. März 1922.)

In den letzten Jahren hat man eine erhöhte Aufmerksamkeit den organischen Phosphorsäureabkömmlingen zugewendet, insbesondere den *esterartigen Verbindungen der Zuckerarten mit Phosphorsäure.* Das Interesse, das man an diesen Substanzen nimmt, geht im wesentlichen auf folgende Beobachtungen zurück:

Im Jahre 1905 entdeckte der russische Pflanzenphysiologe *L. Iwanoff*, daß Hefenpräparate, wie Dauerhefen und Hefensäfte, imstande sind, zugefügtes anorganisches Phosphat — primäres oder sekundäres Alkaliphosphat — mit Zucker zu verestern. Der anfangs für Triose-monophosphorsäure (*Iwanoff*, vgl. auch *H. v. Euler* und *A. Fódor*) gehaltene, dann von *Lebedew* als Hexose-monophosphorsäure angesprochene Körper ist in seiner richtigen Zusammensetzung von *Harden* und *Young* sowie von *Neuberg, Färber, Levite* und *Schwenk* erkannt worden. Nach den übereinstimmenden Befunden der englischen wie deutschen Forscher liegt Fructose-diphosphorsäure vor. Die von *Harden* und *Young* angenommene zwangsläufige Beteiligung der Hexose-diphosphorsäure am eigentlichen Gärakt ist noch ungewiß. Denn es ist u. a. auffallend, daß Hexose-diphosphat zwar von Hefesäften, aber nicht von ungeschädigten normalen Zellen vergoren wird, und ferner hat *Neuberg* gezeigt, daß es unzweifelhaft Hefen gibt, die vergären, ohne zu phosphorylieren; diese Befunde haben sodann *Svanberg* nebst *Euler* bestätigt. Ein weiterer Gesichtspunkt für die Bedeutung der Zuckerphosphorsäure-Verbindungen ist der, daß nach den Angaben von *Embden* und seinen Mitarbeitern in der Muskulatur eine Verbindung vorkommt, die vielleicht mit dem Zymo-diphosphat identisch oder nahe verwandt ist, indem sie dasselbe komplizierte Phenylhydrazinderivat, das Phenylhydrazinsalz des Hexose-phosphorsäure-osazons, liefert; die erwähnten Autoren lassen es offen, ob das sogenannte Lactacidogen neben der Kohlenhydrat-phosphorsäure-Verbindung noch einen anderen Bestandteil enthält. Man muß auch in Betracht ziehen, daß außer Fructose-diphosphorsäure die entsprechenden Derivate der Glucose, Mannose und amidierten Zucker das selbe Osazon liefern würden, ebenso wie die zugehörigen Monophosphorsäureester. Ein Gleiches gilt für das Mono- und Diphosphat des Enols, das nach den vor bereits 22 Jahren ausgeführten Untersuchungen von *Wohl* und *Neuberg* den drei gärenden Hexosen

gemeinsam ist und dem neuerdings von manchen Seiten auch eine physiologische Bedeutung, allerdings *mehr aus theoretischen Spekulationen* als auf Grund tatsächlicher Feststellungen, für die Vorgänge im Tierkörper zugeschrieben wird.

Weiter muß man sich vergegenwärtigen, daß auch andere Verbindungen der Phosphorsäure mit Zuckerarten oder nahestehenden Substanzen in der Natur vorkommen und eine wichtige Rolle spielen. Erinnert sei an die Glycerinphosphorsäure, das Skelett des Lecithins und seiner Verwandten, und an die Pentosephosphorsäure, den Grundstock der Nucleinsäuren. Hinzu tritt das Phytin, das allerdings als Poly-phosphorsäureester der Cyclose Inosit zu betrachten ist (*Neuberg*). In den weniger bekannten Gehirn- und in Organ-Lipoiden kommen ebenfalls Kohlenhydrat-phosphorsäure-ester, zum Teil Galaktose-phosphorsäure-Verbindungen, vor, und *Fränkel* hat mit *Kafka* vor kürzerer Zeit auch einen Abkömmling der Glucosaminphosphorsäure in der Hirnsubstanz beobachtet.

Die Fähigkeit und das Bestreben der Organismen, Phosphorsäureester in ihrem Stoffwechsel zu bilden bzw. zu verwerten, tritt auch zutage, wenn man das Schicksal der phosphorhaltigen Eiweißkörper, der Phosphorproteine, betrachtet.

Die bei der peptischen Verdauung zunächst entstehenden phosphorsäurehaltigen Albumosen und Polypeptid-phosphorsäuren, ferner die auf chemischem Wege künstlich phosphorylierten Eiweißkörper sowie ihre Albumosen und Peptone spalten unter dem Einfluß von proteolytischen Fermenten den zunächst organisch gebundenen Phosphorsäure-rest wieder ab (*Neuberg* und *Oertel*).

In allen den genannten Fällen wird man *Phosphatasen* anzunehmen haben, d. h. Fermente, deren Aufgabe es ist, in organischer Knüpfung vorhandene Phosphorsäure in Freiheit zu setzen. Über die fermentative Natur dieses Vorgangs, der sich im Zellstoffwechsel ersichtlich vollzieht, liegen bisher nur verhältnismäßig spärliche Untersuchungen vor.

Bezüglich *pflanzlicher Phosphatasen* ist hauptsächlich folgendes bekannt. Hefenzubereitungen, die Zymophosphat erzeugen, enthalten nach *Harden* und *Young* auch ein diesen Körper spaltendes Ferment, die *Hexosen-diphosphatase*. *C. Neuberg* und *L. Karczag*[1]) fanden eine *Glycero-phosphatase*, die glycerinphosphorsaure Salze zerlegt, in den Saccharomyceten auf. *Falk* nebst *Sigiura*[2]) beobachteten ein solches Agens in dem Enzymgemisch der Ricinuslipase. *A. Němec*[3]) tat die allgemeine Verbreitung der Glycero-phosphatase in den Samenorganismen dar. In den Hefepilzen haben *C. Neuberg* und *K. Djenab*[4]) die *Saccharo-phosphatase* (s. unten) entdeckt; deren große Verbreitung in den Vegetabilien gezeigt zu haben, ist das Verdienst von *A. Němec* und *F. Duchon*[5]).

Animalische Phosphatasen sind z. B. in den komplexen Fermenten zugegen, die Phosphatide, Phosphorproteine und Nucleoproteide hydrolysieren[6]). *Eine Glycero-phosphatase* wiesen *P. Grosser* und *J. Husler*[7]) in Tierorganen und deren

[1]) *C. Neuberg* und *L. Karczag*, diese Zeitschr. **36**, 60. 1911.

[2]) *K. G. Falk* und *K. Sugiura*, Ch. C. **1915**, I, 1271.

[3]) *A. Němec*, diese Zeitschr. **93**, 96. 1919.

[4]) *C. Neuberg* und *K. Djenab*, diese Zeitschr. **82**, 391. 1917.

[5]) *A. Němec* und *F. Duchon*, diese Zeitschr. **119**, 74. 1921.

[6]) Auch vegetabilische Fermente, die auf diese Stoffe eingestellt sind, können Phosphatasen enthalten.

[7]) *P. Grosser* und *J. Husler*, diese Zeitschr. **39**, 1. 1912.

Extrakten nach; eine Phosphatase ist weiter in den Organsäften anzunehmen, die nach *H. v. Euler* und *Y. Funke*[1]), nach *G. Embden*, *W. Grießbach*, *E. Schmitz* sowie *F. Laquer*[2]) Hexosediphosphat bzw. Lactacidogen (s. vorher) angreifen. Beim Abbau von künstlich phosphorylierten Produkten der Eiweißreihe mittels Verdauungsfermenten, wobei wieder H_3PO_4 frei wird (*C. Neuberg* und *W. Oertel*) sind gleichfalls Phosphatasen tätig[3]).

Meine Untersuchungen hatten den Zweck, die Kenntnis der bisher wenig erforschten einfachen Phosphatasen des tierischen Organismus zu erweitern.

Zunächst verwandte ich für diese Zwecke eine unzweifelhaft körperfremde Substanz, die synthetisch nach den Angaben von *Neuberg* und *Pollak*[4]) dargestellte *Rohrzucker-mono-phosphorsäure*. Diese Verbindung wird, wie *Neuberg* und *Djenab* (l. c.) bereits gezeigt haben, durch ein in den Hefen, in obergärigen wie untergärigen Rassen, anwesendes Ferment, die *Saccharo-phosphatase*, unter Loslösung von Phosphorsäure hydrolysiert und, im Gegensatz zur erwähnten Hexose-di-phosphorsäure, auch von normalen frischen Hefezellen vergoren. Die Abspaltung von H_3PO_4 selbst erfolgt verhältnismäßig leicht, indem die Salze der Rohrzuckerphosphorsäure sowohl von lebender Hefe als von Hefesaft bei 22—37° zerlegt wurden. Diese Saccharo-phosphatase der Hefe ist bei neutraler, schwach alkalischer oder schwach essigsaurer Reaktion wirksam. Verwendet man das Calciumsalz der Rohrzucker-phosphorsäure, so kann man, wie *Neuberg* und *Djenab* gefunden haben, die Tätigkeit der Phosphatase augenfällig dadurch demonstrieren, daß bei hinreichend konzentrierten Lösungen das in Freiheit gesetzte Calciumphosphat in Form einer charakteristischen dicklichen Gallerte auftritt. Wegen verschiedener Unterschiede, die zwischen dem Agens obwalten, das einerseits unter fast allen Verhältnissen die *Saccharo-mono-phosphate* spaltet, und dem Agens, das lediglich nach Abtrennung von der frischen Hefezelle die *Hexose-diphosphate* angreift, scheint es vorläufig berechtigt, die Saccharo-phosphatase als ein besonderes Ferment anzusehen und es dementsprechend zu bezeichnen. Mit Hilfe der Konstanten, die *R. Willstätter* und *H. v. Euler* neu eingeführt haben, namentlich durch Kontrolle des optimalen Wirkungsbereiches, wird man zu entscheiden vermögen, inwieweit die zuvor benannten Phosphatasen und das jetzt zu behandelnde Enzym ungleich oder identisch sind.

Es ist nun in hohem Grade bemerkenswert, daß auch der *Tierkörper über Saccharo-phosphatase verfügt*. Das Ferment fand sich, wie aus den

[1]) *H. v. Euler* und *Y. Funke*, H. **77**, 488. 1912.

[2]) *G. Embden*, *W. Grießbach* und *E. Schmitz*, H. **93**, 1. 1914/1915; *G. Embden*, *W. Grießbach* und *F. Laquer*, ebenda S. 124.

[3]) *C. Neuberg* und *W. Oertel*, diese Zeitschr. **60**, 491. 1914.

[4]) *C. Neuberg* und *H. Pollak*, diese Zeitschr. **23**, 515 und **26**, 514. 1910; Ber. **43**, 2060. 1910.

nachstehenden Versuchen hervorgeht, in der Niere, in der Leber, in der Milz, im Pankreas, in Gehirn und der Muskulatur. Die angegebene Reihenfolge gibt zugleich die Stärke des Spaltungsvermögens wieder, die für die gleiche Gewichtsmenge der genannten Organe konstatiert werden konnte. Untersucht habe ich die Organe von Rind, Schwein, Kaninchen; weitere Spezies habe ich nicht geprüft. Genau wie bei der Saccharo-phosphatase der Hefe handelt es sich bei der *Saccharo-phosphatase der Tierorgane* um ein *von den lebenden Zellen abtrennbares Enzym.* Jedenfalls habe ich aus Niere und Leber Phosphorsäure ablösende Fermentpräparate ohne Schwierigkeit erhalten; ich beschränkte mich bezüglich der zellfreien Extrakte auf die Verwendung jener beiden Organe.

Als Substrat habe ich zumeist das *rohrzucker-mono-phosphorsaure Natrium* benutzt, jedoch habe ich mich überzeugt, daß auch das lösliche *Calciumsalz* der gleichen Säure zerlegt wird. Im letzten Falle kann man, ganz ähnlich wie bei der Einwirkung von Hefen und Hefeferment, als auffallende Erscheinung die Abscheidung des durch das Enzym in gallertiger Form zutage geförderten Calciumphosphats beobachten.

Da die Saccharo-phosphate in wässeriger Lösung vollkommen beständig sind, so habe ich, um die Versuchsanordnung nicht zu komplizieren, die Einwirkung des Fermentes zumeist im natürlichen Medium, ohne Zusatz von Puffern, untersucht, zumal die empfehlenswerten Phosphatgemische im vorliegenden Falle die Ausführung unbequemer Differenzbestimmungen erfordert haben würden. Ich habe in der Regel die Lösung der genannten Salze einfach mit entsprechenden Mengen Organbrei oder Organsaft behandelt, und zwar im Brutschrank bei 37°.

Nicht untersucht wurde bis jetzt die Frage, ob die Loslösung des Phosphorsäure-restes von einer Veränderung des Rohrzuckeranteils begleitet ist. Das kann gelegentlich nachgeholt werden. Hier genüge der Hinweis, daß die Saccharophosphate eben wegen ihrer Spaltbarkeit nach verschiedenen Richtungen noch Gegenstand eingehender Prüfung sein sollen.

Für die *quantitativen Messungen* der Phosphatase-Wirkung bediente ich mich, um einem Verlust an unlöslichem Calciumphosphat vorzubeugen, ausschließlich des saccharose-phosphorsauren Natriums. Den Digestionsgemischen wurden in bestimmten Zeiten aliquote Mengen entnommen. Zur Beseitigung in Lösung gegangenen Eiweißes wurde genau 10 Minuten lang im Wasserbad koaguliert und das klare Filtrat mit Magnesiamischung in der Kälte gefällt. Nach 20 Stunden wurde das rohe Ammonium-Magnesiumphosphat abfiltriert, ausgewaschen und zur Reinigung in salpetersaurer Lösung auf bekannte Weise in das Phosphorsäuremolybdat übergeführt. Hierin wurde sodann die H_3PO_4 nach der Methode von *Neumann* ermittelt. Selbstverständlich wurden

gleichzeitig und unter Innehaltung identischer Bedingungen der Erwärmung im Wasserbade und der nachherigen Fällung von Phosphorsäure in der Kälte folgende Kontrollbestimmungen vorgenommen:

α) Ermittelung der bei der Autolyse von Organmaterial allein auftretenden Phosphorsäuremenge.

β) Feststellung der Tatsache, daß eine gleich lange digerierte wässerige Lösung von saccharose-phosphorsaurem Natrium gänzlich ungespalten bleibt.

γ) Konstatierung des selben Verhaltens auch in Gegenwart von Essigsäure-Natriumacetat-Puffer.

Die letztgenannte Versuchsanordnung ist deshalb einige Male gewählt worden, um die Beständigkeit der Saccharo-phosphate ebenfalls bei schwach saurer Reaktion zu erweisen, die in autolysierten Organen fast stets auftritt. Das Milieu in diesen Organdigeraten ist wegen des Gehalts an diversen Moderatoren ebenfalls als ein gepuffertes zu betrachten.

Die *Einzelheiten* ergeben sich aus den nachstehend angeführten Versuchsprotokollen.

Experimentelle Belege.

A. Versuche mit Kaninchen-Organen.

5 g Organbrei wurden mit 50,0 ccm 5 proz. Lösung von Natrium-saccharose-phosphat nebst 3,0 ccm Toluol vermischt und unter öfterem Umschütteln bei 37° im Brutschrank belassen. Nach 4—6tägiger Digestion wurden 25,0 ccm der Aufschwemmung entnommen, im siedenden Wasserbade genau 10 Minuten lang erwärmt und nach dem Erkalten filtriert. Mit 15,0 ccm des klaren Filtrates wurde die Phosphorsäureabspaltung auf die zuvor angegebene Art ermittelt. Da Natrium-saccharo-phosphat $C_{12}H_{21}O_{10} \cdot OPO_3Na_2$ 15,24% P_2O_5 enthält, so entsprechen 50ccm 5 proz. Natrium-saccharophosphats (= 2,5 g) 0,381 g P_2O_5.

An den Kontrollversuchen habe ich festgestellt, daß sowohl in der rein wässerigen Lösung als auch in der Acetat-Puffermischung eine Hydrolyse des Natrium-saccharo-phosphates nicht stattfand.

Tabelle I.

5 g Organbrei	Nach 4 tägiger Digestion			
	Menge P_2O_5 abgespalten			
	durch Autolyse des Organs allein in mg	mit der Saccharophosphatlösung in mg	aus dem Saccharophosphat in mg	aus dem Saccharophosphat in %
Muskel	19,3	21,6	2,3	0,60
Leber	26.7	57,1	30.4	7,98
Niere	29,9	102,4	72.5	19,03

Die Resultate, die hier wie im folgenden immer auf das *Gesamtvolumen* bezogen sind, geben Tabellen I und II wieder:

Tabelle II.

5 g Organbrei	Nach 6 tägiger Digestion: Menge P_2O_5 abgespalten durch Autolyse des Organs allein in mg	mit der Saccharophosphatlösung in mg	aus dem Saccharo-phosphat in mg	in %
Muskel	22,6	26,3	3,7	0,97
Leber	26,9	65,3	38,4	10,08
Niere	30,9	187,8	156,9	41,18

Bei Betrachtung der soeben angeführten beiden Tabellen sieht man, daß die saccharo-phosphat-spaltende Kraft der Organe bis auf den Muskel eine ziemlich bedeutende ist.

B. Versuche mit frischen Schweine-Organen.

Bei diesen Experimenten kamen Muskel, Leber, Niere, Milz, Pankreas und Gehirn in Anwendung; die Ansätze wurden in derselben Weise bereitet wie vorher beschrieben. Die Befunde sind in den nachstehenden Tabellen verzeichnet.

Tabelle III.

5 g Organbrei	Nach 4 tägiger Digestion: Menge P_2O_5 abgespalten durch Autolyse des Organs allein in mg	mit der Saccharophosphatlösung in mg	aus dem Saccharo-phosphat in mg	in %
Muskel	17,4	38,2	20,8	5,45
Leber	21,9	104,4	82,5	21,65
Niere	14,9	137,1	122,2	32,07
Milz	26,7	119,5	92,8	24,36
Pankreas	23,2	91,2	68,0	17,85
Gehirn	16,0	48,2	32,2	8,45

Tabelle IV.

5 g Organbrei	Nach 8 tägiger Digestion: Menge P_2O_5 abgespalten durch Autolyse des Organs allein in mg	mit der Saccharophosphatlösung in mg	aus dem Saccharo-phosphat in mg	in %
Muskel	18,1	49,1	31,0	8,13
Leber	29,7	135,3	105,6	27,72
Niere	23,6	178,2	154,6	40,57
Milz	29,3	150,0	120,7	31,68
Pankreas	23,6	137,2	113,6	29,81
Gehirn	17,0	71,9	54,9	14,41

Den Tabellen III und IV kann man entnehmen, daß die Phosphatasetätigkeit ungleicher Organe desselben Tieres beträchtliche Unterschiede aufweist. Bemerkenswert erscheinen die Befunde für Muskel, bei dem auch diesmal, wie gemäß den Tabellen I und II, die Menge der abgespaltenen Phosphorsäure nur gering ist.

C. Versuche mit Rinder-Organen.

Die Organe wurden gut gekühlt vom Schlachthofe bezogen. Versuchsanordnung wie vordem.

Tabelle V.

5 g Organbrei	Nach 2 tägiger Digestion — Menge P_2O_5 abgespalten			
	durch Autolyse des Organs allein in mg	mit der Saccharo-phosphatlösung in mg	aus dem Saccharo-phosphat in mg	aus dem Saccharo-phosphat in %
Muskel	13,5	17,4	3,9	1,02
Leber	20,9	71,9	51,0	13,38
Niere	19,7	97,8	78,1	20,50
Milz	22,4	63,8	41,4	10,86

Tabelle VI.

5 g Organbrei	Nach 7 tägiger Digestion — Menge P_2O_5 abgespalten			
	durch Autolyse des Organs allein in mg	mit der Saccharo-phosphatlösung in mg	aus dem Saccharo-phosphat in mg	aus dem Saccharo-phosphat in %
Muskel	15,4	27,0	11,6	3,04
Leber.	27,8	130,7	102,9	27,02
Niere	20,5	203,0	182,5	47,90
Milz	24,3	119,4	95,1	24,96

Alle 6 Tabellen lehren, daß ein und dasselbe Organ verschiedener Tierarten nicht sehr ungleiche Werte für den Gehalt an Saccharo-monophosphatase lieferte; für die diversen Gewebe desselben Tieres bestehen jedoch erhebliche Schwankungen. Ferner zeigte sich, daß die saccharophosphatspaltende Wirkung bei der Niere am stärksten hervortrat, während sie bei der Leber, der Milz und dem Pankreas etwas schwächer und beim Muskel am geringsten war.

D. Organsaft-Versuche mit Na-Saccharophosphat.

Zur Bestätigung der Ansicht, daß die Phosphorsäure-Abspaltung *fermentativ* geschieht, stellte ich einige Versuche mit *Organextrakten* an. Zur Anwendung gelangten Auszüge aus Leber und Niere von Schwein sowie Rind.

Die Extrakte wurden folgendermaßen hergestellt: Eine bestimmte Menge des zerkleinerten Organs wurde mit der doppelten Menge physiologischer Kochsalzlösung (0,85% NaCl) übergossen und nach Hinzufügung von Toluol als Antisepticum eine Nacht im Eisschrank belassen, worauf die Filtration geschah.

50,0 ccm Filtrat wurden mit 2,5 g festem Na-Saccharo-phosphat sowie 3 ccm Toluol vermischt, geschüttelt und bei 37° im Wärmeschrank gehalten.

Die Ergebnisse sind wie zuvor auf die Gesamtmenge bezogen und wieder tabellarisch niedergelegt:

Versuche mit Säften aus Schweine-Organen.

Tabelle VII.

Nach 4 tägiger Digestion

50,0 ccm Organsaft	Menge P_2O_5 abgespalten			
	aus dem Saft allein in mg	mit der Saccharo-phosphatlösung in mg	aus dem Saccharo-phosphat in mg	aus dem Saccharo-phosphat in %
Leber	21,3	31,3	10,0	2,63
Niere	17,5	107,5	90,0	23,62

Tabelle VIII.

Nach 8 tägiger Digestion

50,0 ccm Organsaft	Menge P_2O_5 abgespalten			
	aus dem Saft allein in mg	mit der Saccharo-phosphatlösung in mg	aus dem Saccharo-phosphat in mg	aus dem Saccharo-phosphat in %
Leber	29,3	46,3	17,0	4,46
Niere	17,0	136,6	119,6	31,39

Versuche mit Säften aus Rinder-Organen.

Tabelle IX.

Nach 4 tägiger Digestion

50,0 ccm Organsaft	Menge P_2O_5 abgespalten			
	aus dem Saft allein in mg	mit der Saccharo-phosphatlösung in mg	aus dem Saccharo-phosphat in mg	aus dem Saccharo-phosphat in %
Leber	22,7	74,3	51,6	13,54
Niere	24,6	72,3	47,7	12,52

Tabelle X.

Nach 8 tägiger Digestion

50,0 ccm Organsaft	Menge P_2O_5 abgespalten			
	aus dem Saft allein in mg	mit der Saccharo-phosphatlösung in mg	aus dem Saccharo-phosphat in mg	aus dem Saccharo-phosphat in %
Leber	28,3	130,3	102,0	26,77
Niere	26,6	89,8	63,2	16,59

Es offenbart sich somit, daß auch den Organextrakten eine saccharophosphat-spaltende Kraft zukommt. (Der Umstand, daß in den Saftversuchen das Ferment der Niere weniger wirksam war als das der Leber, hängt wohl mit der einfachen Bereitungsart der Säfte zusammen; vielleicht gibt dabei die Leber leichter ihr Enzym ab.)

Zusammenfassung.

Aus den beschriebenen Untersuchungen geht mit Sicherheit hervor, daß tierische Organe und daraus bereitete Säfte die Fähigkeit besitzen, aus den Salzen der Rohrzucker-mono-phosphorsäure anorganisches Phosphat abzuspalten. Es bestehen hinsichtlich dieser Phosphatasewirkung keine sehr wesentlichen Unterschiede zwischen den Geweben von Rind, Schwein und Kaninchen.

Nach der Stärke des Verseifungsvermögens ordnen sich die Organe folgendermaßen: Niere, Leber, Milz, Pankreas, Gehirn, Muskel.

Im Hinblick auf Beziehungen von Phosphorsäure zum Stoffwechsel des Muskels hätte man vielleicht eine besonders kräftige Phosphatasebetätigung in der Muskulatur erwarten sollen. Bei meiner Versuchsanordnung trat jedoch das Gegenteil zutage, indem der Muskel bei weitem am schwächsten die Rohrzucker-mono-phosphorsäure angriff.

Das betreffende Ferment wird als animalische Saccharo-phosphatase bezeichnet; durch Kochen wird es zerstört.

Zur Kenntnis der Phosphatasen.

II. Mitteilung.

Hexose-mono-phosphatase.

Von

M. Tomita.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Chemische Abteilung, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 22. März 1922.)

Wie in der Einleitung zur voranstehenden Arbeit erwähnt ist, kann man mit Hilfe geeignet präparierter Hefe Hexose-diphosphat gewinnen. Da die selbe Verbindung aus Traubenzucker, Mannose und Fructose entsteht, so ist es denkbar, daß es sich hier um einen Di-phosphorsäureester des den 3 genannten Hexosen gemeinsamen Enols handelt; ihm erteilt man nach *Wohl* und *Neuberg*[1]) die Formel

$$CH_2OH - \overset{H}{\underset{OH}{C}} - \overset{H}{\underset{OH}{C}} - \overset{OH}{\underset{H}{C}} - C(OH) = CH(OH)$$

zu. Während nun diese Hexose-di-phosphorsäure im normalen Gärakt, d. h. durch gewöhnliche frische Hefen, nicht mit Sicherheit gebildet, jedenfalls aber nicht vergoren wird, ist die *Hexose-mono-phosphorsäure* der alkoholischen Zuckerspaltung fähig. Die Hexose-mono-phosphorsäure erhielt *Neuberg* durch Abbau des Hexose-diphosphats, und zwar durch gemäßigte Behandlung mit verdünnten Säuren, am besten mit Oxalsäure[2]); unter richtig gewählten Bedingungen wird dabei nämlich nur 1 Phosphorsäuremolekül abgespalten. Geht man von den schwerlöslichen Erdalkalisalzen des Hexose-diphosphats[3]) aus, so gelangt man durch Behandlung mit überschüssiger Oxalsäure und durch deren anschließende Entfernung mittels Bariumcarbonat zum leicht löslichen Bariumsalz der Hexose-mono-phosphorsäure. Dieses kann durch Alkohol ausgefällt und durch mehrmaliges Umlösen gereinigt werden.

Zu den Versuchen über die *Hexose-mono-phosphatase* diente als Substrat aus analytischen Gründen das sekundäre *Natriumsalz*, das man durch genaue Umsetzung des Barium-hexose-mono-phosphats mit schwefelsaurem Natrium darstellt.

---

[1]) *A. Wohl* und *C. Neuberg*, B. **33**, 3095. 1900.

[2]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 88, 432. 1918.

[3]) Das käufliche Calciumsalz, das Candiolin der Farbenfabriken vorm. *Fr. Bayer & Co.*, kann nach entsprechender Reinigung Verwendung finden.

Es zeigte sich, daß die *Organe des Warm- und Kaltblüters ein Ferment enthalten, das die Hexose-mono-phosphorsäure hydrolysiert.* Die Reihenfolge der Wirksamkeit scheint für die einzelnen Organe ungefähr die gleiche zu sein wie bezüglich der Saccharo-phosphatase[1]): Niere, Milz, Leber, Muskel spalteten mit abnehmender Kraft. Weitere Organe habe ich nicht geprüft. Durch Vornahme aller Versuche in Gegenwart von Toluol ist der fermentative Charakter der Reaktionen dargetan.

Die Sicherstellung der Ergebnisse erforderte besondere Kontrollversuche, weil die Salze der Hexose-mono-phosphorsäure in Lösung nicht so beständig sind wie die Saccharophosphate. Es findet nämlich beim Stehen allmählich eine geringe Abspaltung von anorganischem Phosphat statt, und zwar sowohl in reinem Wasser als in einer Lösung von Natriumacetat-Essigsäure-Puffer.

Die *Versuchsanordnung und Ausführung der Analysen* geschah ähnlich wie in der voraufgehenden Mitteilung unter allen gebotenen Vorsichtsmaßregeln. Wegen jener Selbstzersetzlichkeit der hexose-mono-phosphorsauren Salze ist die genaue Beachtung der Zeiten und gleiche Dauer bei Hauptansatz und Leerversuch unerläßlich.

Im einzelnen verfuhr ich folgendermaßen:

A. Versuche mit Kaninchenorganen.

4 g hexose-mono-phosphorsaures Barium wurden in Wasser gelöst, mit der berechneten Menge Na_2SO_4 in Lösung versetzt, filtriert und auf 200 ccm aufgefüllt. 50,0 ccm dieser Lösung, mit 5 g Organbrei und 3 ccm Toluol vermischt, wurden in den Brutschrank bei 37° gesetzt. Da Barium-hexosemonophosphat $C_6H_{11}O_5PO_4Ba + H_2O$ 17,17% P_2O_5 enthält, so sind in 200,0 ccm Natrium-hexose-monophosphatlösung (entsprechend 4 g Bariumsalz) 0,6868 g P_2O_5 vorhanden. Demnach sind in obiger Lösung von 50,0 ccm 0,1717 g P_2O_5 enthalten. In den Kontrollversuchen wurde festgestellt, wieviel freies Phosphat in der wässerigen Lösung des Estersalzes allein auftritt.

Die folgenden Tabellen veranschaulichen die Befunde für die Gesamtansätze:

Tabelle I.

5 g Organbrei	Nach 8tägiger Digestion — Menge P_2O_5 abgespalten: durch Autolyse des Organs in mg	in der Hexose-mono-phosphatlösung ohne Organ in mg	in der Hexose-mono-phosphatlösung mit Organbrei in mg	aus dem Hexose-mono-phosphat in mg	aus dem Hexose-mono-phosphat in %
Muskel . .	31,2	25,8	92,4	35,4	20,61
Leber . . .	32,1	25,8	125,1	67,2	39,14
Niere . . .	27,0	25,8	159,9	107,1	62,37

[1]) *M. Tomita*, diese Zeitschr. **131**, 161. 1922.

Tabelle II.

5 g Organbrei	Nach 6 tägiger Digestion				
	Menge P_2O_5 abgespalten.				
	durch Autolyse des Organs	in der Hexose-mono-phosphatlösung ohne Organ	in der Hexose-mono-phosphatlösung mit Organbrei	aus dem Hexose-mono-phosphat	
	in mg	in mg	in mg	in mg	in %
Muskel . .	37,5	26,7	118,2	54,0	31,45
Leber . . .	46,8	26,7	160,8	87,3	50,84
Niere . . .	28,5	26,7	164,7	109,5	63,77

B. Versuche mit Karpfenorganen.

5 g Organbrei wurden mit 50,0 ccm oben erwähnter Natrium-hexose-mono-phosphatlösung sowie 3 g Toluol vermischt und bei 37° im Thermostaten belassen. Nach 9 tägiger Bebrütung wurde die freigewordene Phosphorsäure bestimmt. Dabei zeigte sich folgendes:

Tabelle III.

5 g Organbrei	Nach 9 tägiger Digestion				
	Menge P_2O_5 abgespalten				
	durch Autolyse des Organs	in der Hexose-mono-phosphatlösung ohne Organ	in der Hexose-mono-phosphatlösung mit Organbrei	aus dem Hexose-mono-phosphat	
	in mg	in mg	in mg	in mg	in %
Muskel . .	34,1	27,5	123,2	61,6	35,88
Leber . . .	17,6	27,5	148,8	103,7	60,39
Milz . . .	28,6	27,5	177,4	121,3	70,64

Aus den Tabellen I—III geht hervor, daß in verschiedenen Geweben des Kaninchens und Karpfens ein Agens vorhanden ist, welches aus der Lösung hexose-monophosphorsauren Natriums H_3PO_4 in reichlicher Menge freimacht. Dabei ist es bemerkenswert, daß die verseifende Wirkung der Niere, der Leber und der Milz sehr bedeutend, die des Muskels jedoch viel schwächer ist. Die Verhältnisse liegen ähnlich wie beim Saccharophosphat.

C. Versuche mit Hexose-mono-phosphat und verschiedenen Organen unter Zusatz von Acetat-Puffer.

Da die enzymatische Zerlegung und der Selbstzerfall des Hexose-mono-phosphats durch die verschiedene Reaktion der betreffenden Gemische etwas beeinflußt werden könnte, habe ich einige Experimente mit Rinder- und Karpfenorganen unter Zugabe von Acetat-Puffer in sonst gleicher Weise ausgeführt.

Die aus 4 g hexose-mono-phosphorsaurem Barium und der berechneten Menge Natriumsulfat bereitete Lösung wurde filtriert und auf

ein Volumen von 200 ccm gebracht. 30,0 ccm wurden entnommen und mit 3 g Organbrei, 30,0 ccm Acetat-Puffer (1 Mol $CH_3 \cdot COOH$ nebst 2 Mol $CH_3 \cdot COONa + 3\,H_2O$ im Liter) und 3 ccm Toluol vermischt. Temperatur 37°. Nach der früher angeführten Berechnung entsprechen 30,0 ccm Natriumhexose-mono-phosphatlösung 0,1030 g P_2O_5.

Die Ergebnisse werden in den nachfolgenden Tabellen wiedergegeben.

α) Versuche mit Rinderorganen.

Tabelle IV.

3 g Organbrei	Nach 4 tägiger Digestion				
	Menge P_2O_5 abgespalten				
	durch Autolyse des Organs in mg	in der Hexose-mono-phosphatlösung ohne Organ in mg	in der Hexose-mono-phosphatlösung mit Organbrei in mg	aus dem Hexose-mono-phosphat in mg	in %
Muskel . .	10,6	10,1	39,4	18,7	18,15
Leber . . .	10,7	10,1	58,0	37,2	36,11
Niere . . .	7,9	10,1	64,4	46,4	45,05

Tabelle V.

3 g Organbrei	Nach 7 tägiger Digestion				
	Menge P_2O_5 abgespalten				
	durch Autolyse des Organs in mg	in der Hexose-mono-phosphatlösung ohne Organ in mg	in der Hexose-mono-phosphatlösung mit Organbrei in mg	aus dem Hexose-mono-phosphat in mg	in %
Muskel . .	10,7	10,9	44,2	22,6	21,94
Leber . . .	11,2	10,9	64,7	42,6	41,36
Niere . . .	8,4	10,9	67,1	47,8	46,40

β) Versuche mit Karpfenorganen.

Tabelle VI.

3 g Organbrei	Nach 9 tägiger Digestion				
	Menge P_2O_5 abgespalten				
	durch Autolyse des Organs in mg	in der Hexose-mono-phosphatlösung ohne Organ in mg	in der Hexose-mono-phosphatlösung mit Organbrei in mg	aus dem Hexose-monophosphat in mg	in %
Muskel . .	11,2	13,3	49,9	25,4	24,66
Leber . . .	10,9	13,3	79,0	54,8	53,20
Milz . . .	16,8	13,3	84,2	54,1	52,52

Aus den Daten der Tabellen IV—VI ist zu ersehen, daß sich die Hexose-mono-phosphat-Spaltung auch in gepuffertem Milieu vollzieht.

Zusammenfassung.

In den Organen der Kalt- und Warmblüter findet sich ein Ferment, das *hexose-mono-phosphorsaure Salze* zerlegt. Niere wirkt wieder sehr kräftig verseifend, Muskel am schwächsten. Dieses Verhalten erscheint beachtenswert, weil man sich vorstellen kann, daß der Abbau des durch *Embdens* und seiner Mitarbeiter wichtige Untersuchungen bekannt gewordenen physiologischen Lactacidogens, falls dieses mit Hexose-diphosphat weitgehend identisch ist, wie viele Enzymreaktionen wohl in Absätzen vollzogen wird. Dabei könnte dann auch die Stufe einer Hexose-mono-phosphorsäure durchlaufen werden. Die Organversuche ergeben aber keine bevorzugte Stellung für die Spaltungskraft der Muskulatur im Vergleich mit den übrigen Organen; hierin braucht jedoch aus verschiedenen Gründen kein Widerspruch zu liegen.

Schließlich ist noch zu bemerken, daß die Hydrolyse der Zuckerphosphorsäureverbindungen durch Organfermente des Warm- und Kaltblüters bei der Hexose-mono-phosphorsäure stärker ist als bei der Saccharose-mono-phosphorsäure; demnach wird man mit Vorbehalt für beide Erscheinungen vorläufig verschiedene, wenn auch sehr ähnliche Phosphatasen annehmen dürfen.

Über den Einfluß des Thyroxins auf die alkoholische Gärung.

Von

M. Tomita.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Chemische Abteilung, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 14. März 1922.)

Es sind mannigfache Bestandteile des pflanzlichen und tierischen Organismus bekannt, die zur Gruppe der Vitamine gehören und anregend auf verschiedene Stoffwechselfunktionen einwirken. Man muß aber, wie *Neuberg*, *Reinfurth* und *Sandberg* bereits hervorgehoben haben[1]), mit der Möglichkeit rechnen, daß bei der Verwendung von Präparaten animalischer oder vegetabilischer Herkunft zu den erwähnten Zwecken außer Vitaminen, deren Struktur noch unaufgeklärt ist, auch Körper von chemisch definiertem Charakter beteiligt sind. Ich erinnere nur daran, daß die früher rätselhaften Wirkungen der Schilddrüse und der Nebenniere heute mit Sicherheit auf die Individuen Adrenalin und Thyroxin zurückgeführt worden sind.

Seitdem *K. Kurono*[2]) als erster gezeigt hatte, daß die Vitamine auch den Prozeß der alkoholischen Zuckerspaltung fördern, ist die Rolle vitaminhaltiger Stoffe aus dem Tier- und Pflanzenreich in sehr zahlreichen Arbeiten nach der gleichen Richtung hin untersucht worden, wobei vielfach positive Ergebnisse erzielt werden konnten.

Da nun ein großes Material über chemisch-charakterisierte Stimulatoren der Gärung in den Arbeiten von *Neuberg* und solchen des gleichen Autors mit *Ehrlich*, *Reinfurth* und *Sandberg* vorliegt[3]), wobei es sich um Verbindungen meist einfacher Natur handelt, habe ich es für wünschenswert gehalten, auch das nunmehr in Substanz bekannte *Thyroxin* heranzuziehen, da dieses festgestelltermaßen seinen bedeutenden Einfluß auf den Stoffumsatz schon in sehr kleinen Quantitäten entfaltet.

---

[1]) *C. Neuberg*, *E. Reinfurth* und *M. Sandberg*, diese Zeitschr. **121**, 218. 1921.

[2]) *K. Kurono*, Journ. of the College of Agriculture Imp. University of Tokio **5**, 305. 1915; *K. Kurono* und *M. Gunke*, Journ. of the scientif. agricult. Soc. **1915**, 79.

[3]) Diese Zeitschr. **1918—1921**.

Durch die Freundlichkeit des Herrn Professor Dr. *J. A. Mandel* in *New York* gelangte ich in den Besitz verschiedener Proben von Thyroxin. Dieselben wurden als solche verwendet und zwar derart, daß bestimmte Mengen zu zellfreien Gäransätzen in fester Form gefügt wurden.

Es zeigte sich, daß das Thyroxin eine gärungsbeschleunigende Kraft äußern kann. Im einzelnen ging ich in nachstehender Weise vor:

1. 10,0 ccm Saft aus Patzenhofer Hefe wurden mit 2,0 ccm 5 proz. Traubenzuckerlösung und 0,01 g festem Thyroxin versetzt. Als Kontrolle diente ein thyroxinfreies System, das im übrigen die gleiche Zusammenstellung hatte.

Tabelle I.

Temperatur 16,5°	Zeiten nach												
Entwickelte ccm CO_2	60′	75′	85′	95′	110′	125′	140′	170′	200′	230′	260′	1440′	28[illegible]
in Kontrolle	0,8	1,4	1,9	2,3	3,3	4,5	5,5	6,7	7,0	7,5	7,9	16.5	23,4
im Aktivator-Ansatz .	0,8	1,7	2,1	3,3	4,3	6,1	6,7	7,1	7,5	8,2	8,8	17,6	25,2
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle .	0,0	0,3	0,2	1,0	1,0	1,6	1,2	0,4	0,5	0,7	0,9	1,1	1,8

Für Versuch 2 wurde dieselbe Anordnung gewählt, nur war der Saft aus Senst-Hefe bereitet worden.

Tabelle II.

Temperatur 20°	Zeiten nach							
Entwickelte ccm CO_2	50′	60′	80′	95′	180′	240′	1440′	2880′
in Kontrolle	0,0	0,0	1.4	3,3	8.1	9,8	14,8	16.3
im Aktivator-Ansatz . . .	0,6	1,3	3,0	5,1	10,9	12.9	19,6	21,0
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0,6	1,3	1,6	1,8	2,8	3,1	4,8	4,7

Im Versuch 3 verfuhr ich folgendermaßen: 10,0 ccm Saft aus Hefe der Schultheiß-Brauerei wurde mit 2,0 ccm 5 proz. Traubenzuckerlösung, 1,0 ccm Wasser und 0,1 g Thyroxin versetzt.

Tabelle III.

Temperatur 21°	Zeiten nach										
Entwickelte ccm CO_2	75′	80′	90′	120′	125′	130′	135′	150′	170′	250′	1350′	279[illegible]
in Kontrolle	0,0	0.0	0,2	0,5	0,9	1,4	2,8	5,1	6,8	8,6	12,3	13,8
im Aktivator-Ansatz .	1,5	2,4	6,0	10.4	10,7	10,9	11,2	11,7	12,0	13,0	17.8	19,5
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle .	1,5	2,4	5,8	9,9	9,8	9,5	8,4	6,6	5,2	4,4	5,5	5,7

Wie man sieht, ist die Gärbeschleunigung durch das Hormon überall vorhanden, aber unter verschiedenen Bedingungen in ungleicher Stärke.

Zum Schluß führe ich die für das Thyroxin von seinen Entdeckern in ihren bedeutsamen Mitteilungen[1]) aufgestellten beiden Formeln an

```
   /CHJ\                                           /CHJ\
JCH     C == C – (CH2)2 – CO2H              JCH     C    C – (CH2)2 – CO2H
 |      |    |                     oder      |      |    |
JCH     C    CO                             JCH     C    C(OH)
   \CH//\NH/                                   \CH//\N//                    .
```

Es muß dahingestellt bleiben, ob es sich um die Acceptor-Betätigung einer reduzierbaren Carbonylgruppe oder Doppelbindung bzw. um andere Kräfte des höchst wirksamen Drüsenbestandteiles handelt.

---

[1]) *E. C. Kendall*, Journ. of biol. chem. **39**, 125. 1919. — *E. C. Kendall* und *A. E. Osterberg*, ebenda **40**, 265. 1919.

Über eine biosynthetische Kohlenstoffkettenverknüpfung in der aliphatischen Reihe.

Zur Kenntnis der Carboligase.

V. Mitteilung[1]).

Von

Julius Hirsch.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Chemische Abteilung, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 27. März 1922.)

I.

In den ersten Mitteilungen über diesen Gegenstand haben *C. Neuberg* und *J. Hirsch*[2]) gezeigt, daß bei der alkoholischen Zuckerspaltung in Gegenwart von Bittermandelöl ein optisch-aktiver Ketonalkohol entsteht, der seiner Zusammensetzung nach durch die Verknüpfung eines Moleküls *Benzaldehyd* mit einem Moleküle des bei der Gärung intermediär auftretenden *Acetaldehyds* gebildet sein mußte. Dieser Befund, der in derselben Weise bei den Umsetzungen durch zellfreie Hefemacerationssäfte erhoben werden konnte, stellte das erste Beispiel einer wirklichen *enzymatischen Synthese von mehrgliedrigen Kohlenstoffketten* dar. Aus der irreversiblen Verknüpfung zweier freiwillig nicht miteinander reagierenden Aldehyde war eine längere Kohlenstoffreihe auf fermentativem Wege hervorgegangen. Das hierbei wirksame enzymatische Agens haben die Autoren *Carboligase* benannt. *C. Neuberg* und *H. Ohle*[3]) haben die chemische Struktur des aus Benzaldehyd und dem Acetaldehydrest auf biologischem Wege zusammengefügten Ketols aufgeklärt. Dasselbe ist 1-Phenyl-acetyl-carbinol ($C_6H_5 \cdot CHOH \cdot CO \cdot CH_3$). Sodann hat *C. Neuberg* mit *L. Liebermann*[4]) durch den Nachweis analoger Verknüpfungen — wie die des

---

[1]) Vorgetragen in der Sitzung der Deutschen Chemischen Gesellschaft vom 10. April 1922.

[2]) *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **115**, 282. 1921.

[3]) *C. Neuberg* und *H. Ohle*, diese Zeitschr. **127**, 327. 1921.

[4]) *C. Neuberg* und *L. Liebermann*, diese Zeitschr. **121**, 311. 1921.

o-Chlorbenzaldehyds und des Anisaldehyds mit dem Gärungszwischenprodukt Acetaldehyd — weitere Belege für diese biosynthetische Funktion beibringen können.

Die allgemeine Bedeutung dieser Feststellungen für unser Wissen von den aufbauenden Lebensvorgängen liegt darin, daß *eine* Möglichkeit der enzymatischen Synthese von höheren Kohlenstoffverbindungen aus niederen Stoffwechselerzeugnissen experimentell verifiziert worden war.

Die bisher auf diesem Wege erhaltenen Körper stellen Kohlenstoffverbindungen gemischten Charakters dar; sie setzen sich aus einem aliphatischen und einem aromatischen Radikal zusammen.

II.

Unter den Kohlenstoffverbindungen der belebten Natur nehmen die Substanzen mit rein aliphatischen Kohlenstoffketten — wie die Zuckerarten und ihre Derivate, ferner die Fettsäuren, bestimmte Aminosäuren usw. — einen besonders wichtigen Platz ein. Diese Tatsache war die Veranlassung zu untersuchen, ob nicht *mit Hilfe der Carboligase die Synthese acyclischer Ketonalkohole aus zwei aliphatischen Aldehyden* durchzuführen wäre. Die Aufgabe wurde zunächst für die Komponenten Isovaleraldehyd und Acetaldehyd in Angriff genommen. *Neuberg* und *Hirsch*[1]) haben bereits darauf hingewiesen, daß bisher eine Vereinigung von Benzaldehyd mit fertigem Acetaldehyd durch lebende Hefenzellen oder zellfreies Enzymmaterial nicht durchführbar gewesen ist; die Verkettung erfolgt nur dann, wenn der Acetaldehyd als unmittelbares Zerfallsprodukt bei einer zymatischen bzw. carboxylatischen Zucker- oder Brenztraubensäure-Spaltung in die Reaktion eintritt. Gibt man nun zu einer gärenden Zuckerlösung Isovaleraldehyd, so findet in einem Umfange von mehr als 80% eine Umwandlung zu Amylalkohol statt. *C. Neuberg* und *H. Steenbock*[2]) hatten diese Hydrierung schon bei den Untersuchungen über die phytochemische Reduktion beschrieben. Nach den bisherigen Erfahrungen wird der hierzu benötigte Wasserstoff dem gespaltenen Zuckermolekül entnommen; es handelt sich um „intermediär wirkenden Wasserstoff", der für gewöhnlich den bei der Decarboxylierung der Brenztraubensäure auftretenden Acetaldehyd zum Weingeist reduziert. Eine deutliche carboligatische Umsetzung des Isovaleraldehyds war also nur zu erwarten, wenn der hydrierende Effekt der phytochemischen Reduktion ausgeschaltet werden konnte. Es war daher angezeigt, als biologische Muttersubstanz des nascierenden Acetaldehyds die Brenztraubensäure statt Zucker zu verwenden. Die Brenztraubensäure ($C_3H_4O_3$)

[1]) *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, l. c.
[2]) *C. Neuberg* und *H. Steenbock*, diese Zeitschr. **52**, 494. 1913.

erscheint nämlich im Vergleich zur Hexose ($C_6H_{12}O_6$) als ein Oxydationsprodukt und kann bei der Vergärung keinen Wasserstoff bereitstellen.

In 500 ccm einer 0,8 proz. Brenztraubensäurelösung wurden 50 g Bäckerhefe und 2 g frisch rektifizierter Isovaleraldehyd eingetragen. Nach 48stündiger Aufbewahrung bei 37° wurde durch Messung des entwickelten Kohlendioxyds der Umsatz an Brenztraubensäure zu 85% ermittelt. Die stark reduzierende und lävogyre Maische wurde filtriert und zur Gewinnung des erwarteten Ketonalkohols in der früher[1]) beschriebenen Weise verarbeitet. Beim Ausäthern gingen jedoch nur geringe Mengen eines reduzierenden und optisch-aktiven Anteiles in die ätherische Schicht über, während die wässerige Schicht trotz wiederholter Extraktion die Reaktionen eines Ketonalkohols kräftig beibehielt. Zur Isolierung dieses Produktes wurde die wässerige Lösung durch Erwärmen vom Äther befreit und mit essigsaurem Phenylhydrazin 2 Stunden lang erhitzt. Es fiel ein feinpulveriger Niederschlag aus, der heiß abgenutscht und mit kaltem Alkohol ausgewaschen wurde. Das Präparat zeigte die *Pechmann*sche Osazonprobe. Beim Umkrystallisieren aus der von *Neuberg*[2]) empfohlenen wässerigen Pyridinlösung (70%) fielen goldgelbe Nädelchen aus, die bei 242—243° (unkorr.) schmolzen. Die Elementaranalyse dieses Körpers ergab jedoch überraschenderweise Zahlen, die als N-, C- und H-Werte des vermuteten Osazons $C_4H_9 \cdot C(:N \cdot NH \cdot C_6H_5) \cdot C(:N \cdot NH \cdot C_6H_5) \cdot CH_3$ nicht in Betracht kamen, sondern auf Diacetyl-osazon, $CH_3 \cdot C(:N \cdot NH \cdot C_6H_5) \cdot C(:N \cdot NH \cdot C_6H_5) \cdot CH_3$, stimmten. Die Krystalle hatten den gleichen Schmelzpunkt wie ein aus Diacetyl bereitetes Osazon, und eine Mischprobe beider Präparate führte keine Veränderung des gemeinsamen Verflüssigungsgrades herbei. An der Identität des aus der Maische ausgefällten Osazons mit dem Osazon des Acetyl-methyl-carbinols, $CH_3 \cdot CHOH \cdot CO \cdot CH_3$ war somit nicht zu zweifeln.

Das Auftreten von Acetyl-methyl-carbinol, des γ-Oxy-β-oxo-butans, bei der beschriebenen Versuchsanordnung ist auf die *carboligatische Vereinigung zweier bei der Brenztraubensäuregärung abgespaltener Acetaldehydreste* zurückzuführen. Da im Dimethylketol das einfachste Beispiel eines carboligatischen Erzeugnisses innerhalb der aliphatischen Reihe vorlag, wurde die Fahndung nach dem etwa entstehenden Amyl-methyl-acyloin zunächst zurückgestellt und die Umsetzung der gewöhnlichen Brenztraubensäuregärung, wie sie *Neuberg*[3]) schon vor Jahren beschrieben hatte, bezüglich ihrer biosynthetischen Funktion untersucht. In der Tat gelang es, nach Vergärung einer $^n/_{10}$-Brenztraubensäurelösung das erwartete Acetyl-methyl-carbinol in der Maische nachzuweisen.

III.

Im Gegensatz zu den früher gewonnenen Ketonalkoholen, die mittels der Carboligase aus einem aliphatischen und einem aromatischen Radikal synthetisiert waren, hat man das rein aliphatische Acetyl-methyl-carbinol als natürliches Stoffwechselprodukt verschiedenartiger Bakterien bereits angetroffen; als solches ist es zusammen mit dem zu-

[1]) *Neuberg* und *Hirsch*, l. c.; *Neuberg* und *Ohle*, diese Zeitschr. **128**, 610. 1922.
[2]) *Neuberg*, Ber. **32**, 3384. 1899.
[3]) *Neuberg*, Sitz.-Ber. der Physiol. Gesellschaft 1910/11.

gehörigen Butylenglykol, dem β-γ-Dioxybutan, insbesondere von französischen und englischen Forschern, in den mannigfaltigsten Nährböden aufgefunden worden, ohne daß jedoch über den Chemismus seiner fermentativen Entstehung etwas bekannt war.

Zuerst hat *Grimbert*[1]) das Auftreten des Acetyl-methyl-carbinols bei der Züchtung von bac. tartricus auf Glucose und Saccharose beschrieben. *Desmots*[2]) beobachtete, daß die dem Bac. mesentericus nahestehenden Bakterien aus Traubenzucker, Rohrzucker, Inulin, Dextrin, Glycerin. Mannit, Stärkekleister und Kartoffeln in peptonhaltigen Nährlösungen neben Essigsäure, Valeriansäure und etwas Äthylalkohol ein schwach lävogyres Acetyl-methyl-carbinol erzeugten. *Kling*[3]) berichtete über die oxydative Entstehung des Körpers aus racemischem Butandiol-(2, 3) unter dem Einflusse von Mycoderma aceti sowie von Subtilisbacterien. *Harden* und *Walpole*[4])[5]) fanden den Ketonalkohol zusammen mit dem Butylenglykol bei der Einwirkung von bac. lactis aerogenes auf Glucose und Mannit *Pastureau*[6]) und *Lemoigne*[7]) bei der Umsetzung von Rohrzucker durch bac. subtilis. *Mazé*[8]) gab an, daß Mycoderma aceti auch Milchsäure in Acetylmethyl-carbinol umwandelt, während sein Vorkommen bei der Gärung durch bac lactis fermentens von *Ruot*[9]) erwähnt ist. *Browne*[10]) wies das Ketol im Zideressig und bei der schleimigen Gärung des Rohrzuckersaftes nach; im Weinessig wurde das Acetoin von *Farnsteiner*[11]) und von *Balcom*[12]) aufgefunden.

Die Feststellung des Ketonalkohols bei bakteriellen Umsetzungen und die spätere Mitteilung von *Harden* und *Norris*[13]) über das Auftreten kleiner Mengen von Butylenglykol bei Kulturversuchen mit Bac. lactis aerogenes auf acetaldehydhaltigen Peptonlösungen haben *Neuberg*[14]) schon bei der Aufstellung seiner Gärungsschemata in den Jahren 1908 und 1913 veranlaßt, unter den Umwandlungsmöglichkeiten des beim physiologischen Zuckerabbau auftretenden Acetaldehyds eine „hypothetische Acyloinkondensation" in Erwägung zu ziehen. Die Richtigkeit dieser Annahme ist nunmehr experimentell dargetan. Jene „Acyloinkondensation" ist die Funktion des Carboligase-Fermentes, das *Neuberg* und *Hirsch* in der Hefenzelle entdeckt und auch in zellfreien

[1]) *Grimbert*, C. r. **132**, 706. 1901.
[2]) *Desmots*, C. r. **138**, 581. 1904.
[3]) *Kling*, c. r. **140**, 1456. 1905; A. ch. (8) **5**, 551; Bl. (3) **35**, 214.
[4]) *Harden* und *Walpole*, Proc. Royal. Soc. **77**, 424. 1906. (Ch. C. **1906**. I. 1560.)
[5]) *Walpole*, Proc. Royal. Soc. **83**, 272. (Ch. C. **1911**. I. 1309.)
[6]) *Pastureau*, J. d. Pharm, et de Chim. **27**, 10. 1908.
[7]) *Lemoigne*, C. r. **155**, 792. 1912.
[8]) *Mazé*, C. r. **156**. 1101. 1913.
[9]) *Ruot*, C. r. **157**, 297. 1913.
[10]) *Browne*, Am. Soc. **28**, 467. (Ch. C. **1906**. I. 1794.)
[11]) *Farnsteiner*, Zeitschr. f. Unters. Nahrungs- u. Genußmittel **15**, 321. 1908.
[12]) *Balcom*, Am. Soc. **39**, 309. (Ch. C. **1918**. I. 126.)
[13]) *Harden* und *Norris*, Proc. Royal. Soc. **84**, 492. 1912.
[14]) *Neuberg*, Handbuch der Biochemie **I**, 225. 1908. Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz der Zelle. Monographie. Gustav Fischer. Jena 1913; vgl. auch *Harden* u. *Norris* (l. c.), *Fernbach* u. *Schoen* (Ann. de l'Inst. Pasteur **28**, 709. 1914), *Neuberg* u. *Nord* (Ber. **52**, 2250. 1919) sowie *Neuberg*, *Nord* u. *Wolff* (diese Zeitschr. **112**, 149. 1920).

Hefensäften nachgewiesen haben. Gleichviel aus welchem Nährmaterial die verschiedensten Mikroorganismen das Acetyl-methyl-carbinol auch erzeugen mögen, *die Auffindung dieses Ketonalkohols bei dem biologisch und chemisch durchsichtigen Vorgange der Brenztraubensäuregärung gibt einen endgültigen Beweis für eine formale Biosynthese aus zwei Molekülen Acetaldehyd, und ist zugleich ein erstes Beispiel für die fermentative Bildung einer mehrgliedrigen rein aliphatischen Kohlenstoffkette.*

IV.

Läßt man eine $^{n}/_{10}$-Brenztraubensäurelösung durch unter- oder obergärige Hefe bei 37° vergären, so zeigt die klar filtrierte Maische nach 24—48 Stunden die Reaktionen eines Ketonalkohols: sie reduziert *Fehling*sche Lösung und gibt nach Destillation über Calciumcarbonat eine Flüssigkeit, mit der die Nitroprussidnatriumprobe auch nach Abdampfen des Acetaldehyds positiv ausfällt; ferner lenkt sie das polarisierte Licht nach links ab. Das Ketol ist mit Wasserdampf — im Vakuum bei entsprechend niedrigen Temperaturen — gleichmäßig flüchtig und kann aus der dünnen wäßrigen Lösung mittels Destillation nicht angereichert werden. Ebensowenig gelingt die Extraktion durch einfaches Ausäthern. Eine Isolierung in Substanz und die genaue Bestimmung des optischen Verhaltens scheiterte bisher am Fehlen einer geeigneten Methode. Die einwandfreie Identifizierung als Acetyl-methylcarbinol geschah durch die Bereitung von Derivaten. Es wurden das Phenylosazon, das p-Nitrophenylosazon und das Semicarbazon gewonnen. Die Ausbeute an p-Nitrophenylosazon war am reichlichsten und gab einen Anhaltspunkt für den Umfang der Biosynthese; bis zu 29,2% des theoretisch verfügbaren Aldehyds ist carboligatisch verknüpft worden. Das Auftreten des schwerer flüchtigen, lävogyren 2,3-Butylenglykols, auf das schon zuvor als Begleiter des Dimethylketols verwiesen worden ist, ließ sich dem optischen Verhalten der nicht mehr reduzierenden Destillationsrückstände entnehmen.

Der formelmäßige Reaktionsverlauf bei der biochemischen Synthese des Acetyl-methyl-carbinols ist demnach folgender:

$$2\,CH_3 \cdot CO \cdot COOH \rightarrow 2\,CO_2 + 2\,CH_3 \cdot CHO$$
$$\downarrow$$
$$CH_3 \cdot CHOH \cdot CO \cdot CH_3.$$

Schon 1 Stunde nach Beginn der Brenztraubensäurespaltung läßt sich das Auftreten des Acetyl-methyl-carbinols nachweisen. Die Ketolbildung geht mit der Zerlegung der Brenztraubensäure einher; wie schon oben (S. 179) erwähnt ist, erfährt der Acetaldehyd nur in statu nascendi eine fermentative Verkettung. Es scheint, daß für den Ablauf des aufbauenden Prozesses die Koppelung mit einem katabolischen Vorgange notwendig ist. Die wirkliche und irreversible Vereinigung

von Kohlenstoffketten durch biochemische —C—C— Verknüpfung kann nicht durch Gleichgewichtsverschiebungen[1]), sondern nur durch das Zusammenwirken mit einem vorausgehenden Spaltungsprozesse zustande gekommen sein.

Für die Brenztraubensäuregärung ist die Auffindung des Acetylmethyl-carbinols deshalb von Bedeutung, weil sie eine Lücke zum großen Teile ausfüllen dürfte, die hinsichtlich der quantitativen Analyse dieser Umsetzung bislang noch bestand. *C. Neuberg* und *L. Karczag*[2]) hatten bei ihren ersten bilanzmäßigen Versuchen über die Zerlegung von Brenztraubensäure durch Hefen nur bis zu 50% der theoretisch erwarteten Menge an Acetaldehyd aufgefunden. Ein beträchtlicher Teil dieses Defizits kann nunmehr auf die Verknüpfung des Acetaldehyds zu einer kohlenstoffreicheren Verbindung zurückgeführt werden.

Bei der normalen alkoholischen Hefengärung des Zuckers ist wohl das Zustandekommen dieser biosynthetischen Reaktion nicht zu erwarten. In Korrelation zu dem intermediär auftretenden Acetaldehyd wird ja eine äquivalente Menge „Wasserstoff" verfügbar, welche die Reduktion des Aldehyds zum Alkohol zwangsläufig vollzieht.

Experimentelles[3]).

1. In einem Göransatze von 1500 ccm Gesamtvolumen werden 13,2 g Brenztraubensäure mit 100 g obergärige Hefe (Rasse XII) bei 37° umgesetzt. Nach 48 Stunden ist die Kohlensäurentwicklung beendet und die Maische wird filtriert. Das klare Filtrat reduziert sowohl *Fehling*sche wie *Ost*sche Lösung in der Wärme, nach einigem Stehen auch bei Zimmertemperatur. Mit Nitroprussidnatrium und mehreren Tropfen Natronlauge tritt eine Rotfärbung ein, die nach Ansäuern mit verdünnter Essigsäure violettstichig wird. Diese Reaktion kann auf den entstandenen Ketonalkohol, auf den abgespaltenen Acetaldehyd wie auch auf Reste unvergorener Brenztraubensäure bezogen werden, doch zeigt das Destillat der zuvor neutralisierten Lösung auch nach Verjagen des Acetaldehyds im siedenden Wasserbade den gleichen positiven Ausfall der Probe. Die optische Drehung des Filtrates im 2 dcm-Rohr war = — 0,30°.

Darstellung des Phenylosazons

$$CH_3 \cdot C(:N \cdot NH \cdot C_6H_5) \cdot C(:N \cdot NH \cdot C_6H_5) \cdot CH_3.$$

1200 ccm klar filtriertes Gärgut werden mit einer ausreichenden Menge von Phenylhydrazin-acetat 2 Stunden lang im Wasserbade erhitzt.

[1]) Siehe auch *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **128**, 609. 1922.

[2]) *C. Neuberg* und *L. Karczag*, diese Zeitschr. **36**, 62. 1911.

[3]) Die Versuche sind mit Hilfe von Mitteln ausgeführt, die von der *Centralstelle für Öl- und Fettforschung* dankenswerterweise gewährt worden sind.

Es fällt ein feinpulveriger weißgelber Niederschlag aus, der von der noch heißen Lösung abgesaugt und mit Alkohol und Äther ausgewaschen wird. Rohausbeute: ca. 0,7 g; Schmelzpunkt 241—242°. Beim Umkrystallisieren aus 70proz. Pyridin scheiden sich goldgelbe glänzende Nadeln ab, die bei 243° schmelzen.

0,1473 g Substanz: 0,3898 g CO_2 und 0,0909 g H_2O;
0,1577 g Substanz: 28,75 ccm N (19° und 758 mm).
$C_{16}H_{18}N_4$ Ber. C = 72,18%, H = 6,76%, N = 21,05%;
(266) gef. C = 72,17%, H = 6,84%, N = 20,80%.

0,44 ccm frisch destilliertes Diacetyl werden mit 1,6 ccm Phenylhydrazin in 5 ccm verdünnter Essigsäure 1 Stunde lang im Wasserbade erhitzt. Ausbeute: 0,8344 g Osazon. Nach Umkrystallisieren aus wässeriger Pyridinlösung Smp. 243°. Eine Mischprobe des aus dem Gärgute dargestellten Osazons mit dem aus Diacetyl bereiteten Präparate schmilzt bei 243°.

100 ccm filtriertes Gärgut werden bei 40° im Vakuum destilliert. Die einzelnen, in Anteilen von je 20 ccm aufgefangenen Portionen reduzieren gleichmäßig *Fehling*sche Lösung. Der halbfeste, ebenfalls noch reduzierende Rückstand wird mit 100 ccm Wasser aufgenommen. Bei der erneuten Destillation zeigen die beiden ersten Portionen zu je 20 ccm noch eine deutliche Reduktionskraft gegenüber alkalischer Kupferlösung, die beiden nächsten eine wesentlich schwächere. Der wiederum eingeengte Rückstand weist kein Reduktionsvermögen auf; nimmt man ihn mit ca. 10 ccm Wasser auf, so ist jedoch eine Drehung von —0,60° im 2 dcm-Rohr wahrzunehmen, die auf das Vorhandensein des nicht reduzierenden, laevogyren 2,3 Butylenglykols hindeutet. Die aus 100 ccm Gärgut gewonnenen Destillate werden vereinigt und mit einem Gemisch von 1,6 ccm Phenylhydrazin und 5 ccm verdünnter Essigsäure 2 Stunden lang im Wasserbade erhitzt. Der ausfallende Niederschlag wird abgesaugt und mit Alkohol und Äther gewaschen. Smp. 240—242°. Rohausbeute 76 mg. Aus wäßriger Pyridinlösung umkrystallisiert, schmilzt die Substanz bei 243°.

2. Ein Gäransatz von 2 l Gesamtvolumen enthält 15 g Brenztraubensäure und 150 g Hefe (Rasse XII). Um innerhalb der von lebender Hefe vertragenen Maximalkonzentration an Brenztraubensäure (ca. 1proz. Lösung) eine größere Menge umsetzen zu können, wird im vorliegenden Versuche die vergorene Brenztraubensäure wieder ergänzt, sobald sie etwa zur Hälfte verbraucht ist.

10 ccm des Gärgutes werden sogleich in ein Eudiometer gefüllt, um an der entwickelten Kohlensäuremenge die Umsetzung der Brenztraubensäure verfolgen zu können. Die Vergärung findet bei 37° statt; die Messung des freigewordenen Kohlensäuregases wird nach Ausgleich mit der Zimmertemperatur vorgenommen.

Nach 4 Stunden haben 10,0 ccm Gärgut 11,0 ccm CO_2 geliefert. Unter Berücksichtigung der Temperatur (18°), des Barometerstandes

(748,3 mm) und der Wasserdampftension wird die Menge der umgesetzten Brenztraubensäure zu 11 · 1,7865 · 2 = 39,3 mg ermittelt. Von der in 10 ccm Gärgut vorhandenen Brenztraubensäure (75 mg) sind bereits 52,4% zerlegt. Zum Gesamtgärgut werden nochmals 7,5 g Brenztraubensäure gegeben, so daß der Gehalt jetzt 14,6 g auf 2 l beträgt. 10 ccm dieser Maische entwickeln in weiteren 15 Stunden 10,0 ccm CO_2, was einem Verbrauche von 35,7 mg Brenztraubensäure (= 7,14 g im 2-l-Ansatz) gleichkommt. Nach erneutem Zusatz von 7,5 g Brenztraubensäure und 100 g Hefe (Rasse XII) sind in dem Gesamtvolumen von 2090 ccm wieder 15 g Brenztraubensäure enthalten. 10 ccm dieses Gärgutes produzieren in 24 Stunden 8,5 ccm Kohlensäure, die einer Brenztraubensäureumwandlung zu Acetaldehyd und Acetoin von 30,3 mg (= 6,34 g in 2090 ccm) entsprechen. Der Versuch wird abgebrochen. Von 30 g Brenztraubensäure sind 21,34 g = 71,1% vergoren.

Das Gärgut wird zur Vermeidung sekundärer Oxydationen in einer Kohlensäureatmosphäre filtriert. Das Filtrat reduziert *Fehling*sche Mischung und zeigt im 2-dcm-Rohr eine Drehung von $\alpha = -0,57°$.

Darstellung des p-Nitrophenylosazons

$CH_3 \cdot C(:N \cdot NH \cdot C_6H_4 \cdot NO_2) \cdot C(:N \cdot NH \cdot C_6H_4 \cdot NO_2) \cdot CH_3$.

200 ccm des filtrierten Gärgutes werden mit einer Lösung von 2,6 g p-Nitrophenylhydrazin in 78 ccm einer 40 proz. Essigsäure versetzt; es fällt augenblicklich ein reichlicher orangegelber Niederschlag aus. Es handelt sich um das Nitrophenylhydrazon des durch carboxylatische Spaltung entstandenen *Acetaldehyds*, das sich nach dem Umkrystallisieren aus 25 proz. Alkohol bei 128° verflüssigt. Zu dem vom Niederschlage befreiten Filtrate werden nochmals 5,2 g p-Nitrophenylhydrazin in 40 proz. Essigsäure gegeben, die sich ohne Trübung mischen. Bei 1½ stündigem Erhitzen im Wasserbade fällt dann ein dunkelroter Niederschlag aus, der heiß abgesaugt und mit Alkohol und Äther gewaschen und so zugleich von etwa anhaftendem Brenztraubensäurehydrazon befreit wird. Rohausbeute = 0,61 g. Schmelzpunkt unter Zersetzung bei 308—310°. Unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther, Benzol, kaltem Eisessig; schwer löslich in siedendem Eisessig; leicht löslich in Pyridin. Krystallisiert aus einem siedenden Gemische von Pyridin und Eisessig in scharlachroten, zu Büscheln vereinigten Nadeln, die sich bei 316° (unkorrigiert) zersetzen.

0,1565 g Substanz: 0,3115 g CO_2 und 0,0705 g H_2O.
$C_{16}H_{16}N_6O_4$. Ber. C = 53,93%, H = 4,49%;
(356) gef. C = 54,28%, H = 5,00%.

Die Unlöslichkeit des p-Nitrophenylosazons in Wasser und den meisten organischen Solventien ermöglicht es, aus der Ausbeute annähernd den Umfang der Acetoinbildung zu bestimmen. 75 ccm Filtrat

werden mit 3 g p-Nitrophenylhydrazin in 90 ccm 40proz. Essigsäure vermischt. Der sofort auftretende orangegelbe Niederschlag (siehe oben) löst sich glatt beim Erwärmen im Wasserbade. Nach 2stündigem Erhitzen ist das Osazon als unlösliches rotes Pulver ausgefallen, das von der heißen Lösung abgesaugt, mit Essigsäure, Alkohol sowie Äther gründlich gewaschen und so von Beimengungen befreit wird. Die im Vakuum getrocknete Substanz wiegt 0,460 g. Sie schmilzt bei 310—312°, ist also hinlänglich rein. 0,460 g p-Nitrophenylosazon entsprechen 0,113 g Acetyl-methyl-carbinol, zu dessen Bildung 0,226 g Brenztraubensäure benötigt worden sind. Der Brenztraubensäureumsatz in 75 ccm Gärgut beträgt auf Grund der ausgeführten Kohlensäuremessung 0,765 g; demnach sind 29,2% der decarboxylierten Brenztraubensäure biosynthetisch verwertet worden.

3. In einem Göransatz von 3 l werden 19,3 g Brenztraubensäure angewendet. In 45 Stunden entwickeln 10 ccm Gärgut 14 ccm CO_2 (abgelesen bei 18° und 741 mm). Es sind also 45,8 mg Brenztraubensäure = 71,2% aufgespalten worden. 75 ccm des klar filtrierten Gärgutes werden mit 1,5 g p-Nitrophenylhydrazin in Essigsäure 2 Stunden im siedenden Wasserbade erhitzt. Das ausgefallene, gut gewaschene und im Vakuum getrocknete Osazon wiegt 0,135 g. Hieraus berechnet sich der Umfang der Acetoinbildung zu 19,6% der vergorenen Brenztraubensäure.

Darstellung des Semicarbazons

$$CH_3 \cdot CHOH \cdot C(:N \cdot NH \cdot CO \cdot NH_2) \cdot CH_3.$$

1300 ccm filtriertes Gärgut werden im Vakuum völlig eingeengt. 500 ccm Destillat werden durch Erwärmen im Kohlensäurestrom vom Acetaldehyd befreit und mit einer wäßrig-alkoholischen Lösung von 3 g Semicarbazidchlorhydrat und 3 g Kaliumacetat versetzt. Nach einigen Stunden wird die Lösung im Vakuum bis zur beginnenden Krystallisation eingedampft. Der Niederschlag wird abgenutscht; er wiegt 0,168 g nach dem Trocknen im Exsiccator · 0,0335 g, in 5 ccm Wasser gelöst, zeigen im 1-dcm-Rohr keine Drehung, während die 25 ccm betragende Mutterlauge im 2-dcm-Rohr einen Wert von $\alpha =$ — 1,33° aufweist. Schmelzpunkt 193—194°. Aus wenig Wasser umkrystallisiert, schmolz die in weißen Blättchen ausfallende Substanz unverändert bei 193—194°.

3,66 mg Substanz: 0,922 ccm N (11° und 737 mm).
$C_5H_{11}O_2N_3$ · Ber · N = 28,96%; gef. N = 28,98%.
(145)

500 ccm Destillat werden nochmals in gleicher Weise aufgearbeitet. Die Ausbeute des bei 193—194° schmelzenden Rohproduktes macht 0,2194 aus. 0,0767 g in 5 ccm Wasser gelöst, zeigten im 1-dcm-Rohr $\alpha = \pm 0°$. Die Mutterlauge dreht im 2-dcm-Rohr — 0,60°. Ob diese

Drehung auf ein nicht krystallisierendes optisch-aktives Semicarbazon oder auf beigemengtes lävogyres 2,3-Butylenglykol zurückzuführen ist, konnte nicht entschieden werden. Das durch die Elementaranalyse identifizierte Acetoin-semicarbazon stimmt bezüglich seines Schmelzpunktes mit dem von *H. Biltz*[1]) beschriebenen Körper bestens überein; die Löslichkeit in Wasser war etwas größer, als nach den Angaben der Literatur erwartet wurde; der Ertrag an analysenreiner Substanz war daher nicht sehr ausgiebig.

4. 80 ccm einer 2n-Brenztraubensäurelösung (= 14,08 g) werden mit 175 g Bäckerhefe und Wasser zu einem Gesamtvolumen von 1600 ccm bei 37° angesetzt. In bestimmten Zeitabständen erfolgt a) die quantitative Ermittelung der carboxylatischen Umsetzung in 100 ccm Gärgut durch Ablesen der aus 10 ccm Gärgut entwickelten Kohlensäure, b) die Feststellung der fortschreitenden carboligatischen Synthese durch Ausfällung und Wägung des aus 100 ccm erhältlichen p-Nitrophenylosazons. Die Resultate dieser Bestimmungen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt:

nach	a) Kohlensäure aus 10 ccm Gärgut		Umsatz der Brenztraubensäure für 100 ccm	b) Osazon aus 100 ccm	Acetoin in 100 ccm
Min.	ccm (37°, 756 mm)	mg	mg	mg	mg
60	6,0	10,0	200	48	12
120	12,1	20,2	404	173	43
360	17,4	28,8	576	200	50

Diese wenigen Daten zeigen, daß die Brenztraubensäurespaltung und der biologische Aufbau zeitlich miteinander verknüpft sind. Eine genaue Bilanz der Brenztraubensäuregärung unter Berücksichtigung des synthetischen Produktes muß einer ausgedehnteren, im Gange befindlichen Untersuchung vorbehalten bleiben.

[1]) *H. Biltz*, B. **41**, 1885. 1908.

Krystallisierte Salze einiger physiologisch wichtiger Zuckerphosphorsäure-Verbindungen.

Von

C. Neuberg und **O. Dalmer.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Chemische Abteilung, Berlin-Dahlem.)

Die *Phosphorsäure-ester* der *Zuckerarten* verdienen aus mehrfachen Gründen Beachtung, namentlich in physiologischer Richtung.

Synthetisch sind solche Produkte zuerst durch die Untersuchungen von *Neuberg* und *Pollak*[1]) zugänglich geworden. Auf biochemischem Wege bildet sich eine *Hexose-di-phosphorsäure* aus den Komponenten unter Wasseraustritt bei der Digestion von Alkaliphosphaten und gärfähigen Sechs-Kohlenstoffzuckern mit getrockneter Hefe oder ihrem Saft. Die Zusammensetzung der Substanz wurde von *Harden* und *Young*[2]) als die einer Hexose-di-phosphorsäure erkannt. Als dann verschiedene Autoren andere Ansichten äußerten, wurde die Verbindung erneut von *Neuberg* mit *Färber*, *Levite* und *Schwenk*[3]) eingehend untersucht; das Ergebnis war, daß die Angaben der englischen Forscher durchaus zutreffen.

Durch partielle Hydrolyse konnte *Neuberg* das Hexose-di-phosphat zu einem *Hexose-mono-phosphorsäureester* abbauen[4]), indem bei vorsichtiger Behandlung mit verdünnten Säuren, am besten mit Oxalsäure, ein Phosphorsäure-rest austritt.

Sowohl vom Di-phosphat als vom Mono-phosphat liegen analysenreine, aber amorphe Salze vor. Die gewöhnliche Phenylhydrazinverbindung des Bi-phosphats — sie ist das Phenylhydrazinsalz eines Fruktose-mono-phosphorsäure-osazons — krystallisiert; sie enthält jedoch nicht mehr das unveränderte, zweifach phosphorylierte Molekül des Ausgangszuckers, sondern leitet sich vom *Mono-phosphorsäureester eines Osons* ab[5]). Es erfolgt nämlich bei der Überführung in jenes Osazon nicht nur die bekannte Oxydation am Nachbarkohlenstoffatom zur Carbonylgruppe, sondern auch die Abstoßung des vermutlich hier haftenden einen Phosphorsäure-radikals; daneben tritt weiter

---

[1]) *C. Neuberg* und *H. Pollak*, diese Zeitschr. **23**, 515. 1910; **26**, 514. 1910; B. **43**, 2060. 1913; ferner *C. Neuberg* und *E. Kretschmer*, diese Zeitschr. **36**, 5. 1911.

[2]) *A. Harden* und *W. J. Young*, diese Zeitschr. **32**, 173. 1911. — *W. J. Young*, ebenda **32**, 177. 1911.

[3]) *C. Neuberg*, *E. Färber*, *A. Levite* und *E. Schwenk*, diese Zeitschr. **83**, 244. 1917.

[4]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **88**, 432. 1918.

[5]) Vgl. *A. v. Lebedew*, diese Zeitschr. **20**, 114. 1909; **28**, 213. 1910.

die Bildung eines sauren Phenylhydrazin-salzes mit dem verbleibenden Mono-phosphorsäure-ester des Hexosazons ein. Eine Darstellung äußerst unbeständiger Hydrazone, die sich bald verfärben und nicht umkrystallisieren lassen, führte *W. J. Young* (l. c.) aus.

Da die *Hexose-mono-* wie *di-phosphorsäure* auch als *Substrate in der Fermentchemie* für Untersuchungen über die *Phosphatasen*[1]) eine Bedeutung erlangt haben, so war es von Interesse, *krystallisierte reine Salze* der wohl nicht sehr beständigen und bislang nicht in reinem Zustande erhaltenen freien Säuren darzustellen, aus denen der Di-phosphorsäure-ester und der Mono-phosphorsäure-ester als unveränderte Grundkörper in einfacher Weise zurückgewonnen werden können. Das war, wie aus dem Folgenden ersichtlich ist, durch Bereitung verschiedener *Alkaloidsalze* möglich; sie krystallisieren schön und sind völlig einheitlich.

Für die erwähnten Enzymstudien mit Phosphatasen liegt ferner in der nach *Neuberg* und *Pollak* synthetisch zugänglichen *Saccharose-mono-phosphorsäure* ein besonders bequemes Testobjekt vor[2]). Zu den Saccharo-mono-phosphaten gelangt man durch Behandlung des Rohrzuckers mit Phosphoroxychlorid in Gegenwart von Säure bindenden Mitteln *(Phosphorylierung)*. Das entstehende Produkt ist bisher zwar ebenfalls in analytisch reiner Form, aber nicht in krystallisiertem Zustande erhalten worden. Es wurde der gleiche Weg zur Gewinnung krystallisierter Abkömmlinge eingeschlagen. Wir waren hier imstande, das rohrzucker-mono-phosphorsaure Strychnin in wohl krystallisierter Form abzuscheiden.

I. Hexose-mono-phosphorsaures Strychnin.

2,1864 g Strychninsulfat $(C_{21}H_{22}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 + 6\,H_2O = {}^1/_{400}$ Mol. werden durch Erwärmen in 100° ccm Wasser gelöst. Die heiße Lösung wird dann unter Umrühren mit 50 ccm einer $^m/_{20}$-Lösung von hexose-mono-phosphorsaurem Barium versetzt. Um die in der heißen wäßrigen Lösung leicht eintretende hydrolytische Dissoziation zurückzudrängen, die sich durch Abscheidung von freiem Alkaloid neben dem ausfallenden Bariumsulfat bemerkbar macht, fügt man sofort 50—100 ccm abs. Alkohol hinzu. Nach einigem Stehen in der Wärme wird vom Bariumsulfat getrennt und das Filtrat unter vermindertem Druck bei 40° Badtemperatur bis fast zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird mehrfach aus einem Gemisch von Alkohol und wenig Wasser umkrystallisiert und bildet dann, je nach der Geschwindigkeit der Abscheidung, Nadeln oder derbe Prismen. Diese haben keinen eigentlichen Schmelzpunkt, da bereits bei 115—120° starkes Sintern eintritt. Bei weiterem Erhitzen färbt sich die Substanz gelb und ist bei 150°

[1]) Vgl. die Mitteilungen von *M. Tomita* (diese Zeitschr. **131**, 161 und 170. 1922); dort auch die Literatur.

[2]) *C. Neuberg* und *K. Djenab*, diese Zeitschr. **82**, 391. 1917. — Ferner *M. Tomita*, diese Zeitschr. **131**, 161. 1922, wo auch die einschlägige Literatur angegeben ist.

ganz braun und schaumig. In absolutem Alkohol ist das Strychninestersalz ziemlich schwer löslich, ebenso in Wasser, womit es in der Hitze teilweise zerfällt. Von Aceton, Essigester und Äther wird es sehr schwer aufgenommen.

Es krystallisiert mit 5 Mol. Wasser, die es zum Teil bereits im Exsiccator, vollständig aber erst nach achtstündigem Erwärmen im Hochvacuum bei 78° verliert und beim Stehen an der Luft in mehreren Stunden wieder aufnimmt.

0,3574 g Substanz (lufttrocken) verloren 0,0318 g H_2O.
$(C_{21}H_{22}N_2O_2)_2 \cdot C_6H_{13}O_9P + 5\,H_2O$:
Ber. H_2O = 8,84%; gef. 8,90%.

Die Phosphorsäurebestimmungen wurden nach Schmelzen der Substanz mit Soda-Salpetergemisch gemäß der Methode der Molybdat- und Magnesiafällungen ausgeführt.

0,2692 g Substanz (lufttrocken) gaben 0,0286 g $Mg_2P_2O_7$.
$(C_{21}H_{22}N_2O_2)_2 \cdot C_6H_{13}O_9P + 5\,H_2O$:
Ber. P = 3,05%; gef. 2,96%.
0,3239 g Substanz (wasserfrei) lieferten 0,0380 g $Mg_2P_2O_7$.
$(C_{21}H_{22}N_2O_2)_2 \cdot C_6H_{13}O_9P$:
Ber. P = 3,34%; gef. 3,27%.
0,1554 g Substanz (lufttrocken) entwickelten 7,6 ccm N (17° und 764 mm. KOH = 33%).
$(C_{21}H_{22}N_2O_2)_2 \cdot C_6H_{13}O_9P + 5\,H_2O$:
Ber. N = 5,50%; gef. 5,70%.

Optische Drehung der lufttrockenen Substanz in 50 proz. Alkohol:

Präparat I: $[\alpha]_{17}^{D} = -30{,}61°$
($c = 1{,}372$, $l = 2$, $\alpha = -0{,}84°$).
Präparat II: $[\alpha]_{17}^{D} = -30{,}86\%$
($c = 1{,}442$, $l = 2$, $\alpha = -0{,}89°$).

Um das Strychninsalz in das Bariumsalz zurückzuverwandeln, löst man es in Wasser und versetzt es mit der berechneten Menge eingestellter Barytlösung. Nach dem Abfiltrieren des Bariumsulfates und Einengen des Filtrates kann man das hexose-mono-phophorsaure Barium mit Alkohol oder Aceton als weißes Pulver niederschlagen. Nach dem Trocknen im Hochvakuum bei 60° zur Gewichtskonstanz zeigte es die Drehung $[\alpha]_{17}^{D} = +2{,}89°$ ($c = 2{,}076$, $l = 2$, $\alpha = +0{,}12°$).

Aus 0,2376 g wasserfreie Substanz entstanden 0,1410 g $BaSO_4$. $C_6H_{11}O_9PBa$: Ber. Ba = 34,74%; gef. 34,92%.

II. Hexose-mono-phosphorsaures Brucin

wird genau wie das entsprechende Strychninsalz bereitet. Zum Umkrystallisieren löst man in möglichst wenig Wasser und fügt Aceton bis zur Trübung hinzu. Das Brucinsalz scheidet sich darauf in gut ausgebildeten Krystallen ab, die sich beim Erhitzen ganz ähnlich wie das Strychninsalz verhalten. Es ist in reinem Wasser löslicher als dieses und wird dem Anscheine nach weniger hydrolysiert. In

Alkohol ist es leicht löslich, schwer in Aceton, unlöslich in Äther. Es enthält 9 Mol. H_2O als Krystallwasser, die es unter denselben Bedingungen verliert bzw. aufnimmt, wie das Strychninsalz. Zersetzt sich nach vorherigem Sintern und Verfärben gegen 160°.

0,3455 g Substanz (lufttrocken) gaben 0,0458 g H_2O.
$(C_{23}H_{26}N_2O_4)_2 \cdot C_6H_{13}O_9P + 9\ H_2O$:
Ber. H_2O = 13,39%; gef. 13,26%.
0,1254 g Substanz (krystallwasserfrei) lieferten 0,0140 g $Mg_2P_2O_7$.
$(C_{23}H_{26}N_2O_4)_2 \cdot C_6H_{13}O_9P$:
Ber. P = 2,96%; gef. 3,11%.
Drehung in 20 proz. Alkohol:

$$[\alpha]_{18}^{D} = -26{,}85°.$$
$$(c = 1{,}620,\ l = 2,\ \alpha = -0{,}87°.)$$

In gleicher Weise, wie oben beschrieben ist, wird auch ein *Cinchonidinsalz* erhalten. Es krystallisiert aus Wasser, von dem es in der Hitze leicht hydrolytisch zerlegt wird, in schönen Nädelchen, die bisweilen einen voluminösen Brei bilden. Der Schmelzpunkt der Verbindung liegt bei etwa 152°, doch tritt bei dieser Temperatur bereits erhebliche Bräunung ein.

III. Hexose-di-phosphorsaures Strychnin

wird durch Umsetzung des entsprechenden sehr wenig löslichen amorphen Bariumsalzes mit schwefelsaurem Strychnin gewonnen.

Strychninsulfat wird in Wasser gelöst und mit dem anderthalbfachen der berechneten Menge von Bariumsalz fünf Stunden lang in einer Stöpselflasche auf der Maschine geschüttelt. Nach dieser Zeit sind in der Lösung keine SO_4-Ionen mehr nachzuweisen. Der Niederschlag, der aus Bariumsulfat, überschüssigem Ausgangsmaterial und freiem Strychnin besteht, wird mittels eines Macherey-Filters entfernt; die klare Lösung wird im Vakuum stark eingeengt. Hierbei scheiden sich reichliche Krystallmengen ab. Beim Aufkochen mit Alkohol geht alles in Lösung bis auf eine flockige Trübung (Bariumsalz unveränderten Di-phosphorsäure-esters), von der abfiltriert wird. Die alkoholische Lösung wird wiederum im Vakuum etwas konzentriert und zur Krystallisation hingestellt, die nötigenfalls durch einen Zusatz von Essigester gefördert werden kann. Die Krystalle sind schwer löslich in absolutem Alkohol, auch in der Hitze, bedeutend leichter in wässrigem Alkohol; sehr schwer löslich sind sie in Essigester, Aceton und Äther. Mit heißem Wasser tritt allem Anscheine nach eine teilweise Dissoziation ein. Zum Umkrystallisieren nimmt man die Substanz in 20 Teilen 85%igen Alkohols auf und fügt zu der heißen Lösung 15 Teile Essigester. Nach zwei- bis viermaliger Wiederholung dieser Prozedur erhält man so ein völlig einheitliches Material, das kleine glänzende Nädelchen bildet und die Zusammensetzung eines sauren Salzes hat. Es sind nämlich nur zwei von den vier sauren Wasserstoffatomen der beiden Phosphor-säure-Reste von dem Strychnin abgesättigt. Die Verbindung, die beim Erhitzen unscharf zerfällt, enthält 2 Mol. Krystallwasser, die nach 10—12 Stunden

im Hochvakuum bei 60° gänzlich fortgehen. Beim Verweilen an der Luft nimmt der wasserfreie Körper schnell an Gewicht zu bis zu der für 2 Mol. H_2O erforderlichen Höhe.

0,1987 g Substanz verloren 0,0074 g H_2O. Gewichtsvermehrung beim Stehen an der Luft 0,0071 g.

0,1858 g Substanz gaben 0,0403 g $Mg_2P_2O_7$.

0,1623 g Substanz (lufttrocken) lieferten 7,45 ccm N (17° und 762 mm).

$(C_{21}H_{22}N_2O_2)_2 \cdot C_6H_{14}O_{12}P_2 + 2\,H_2O$:

Ber. $H_2O = 3{,}45\%$; $P = 5{,}94\%$; $N = 5{,}36\%$;

gef. $H_2O = 3{,}76\%$; $P = 6{,}04\%$; $N = 5{,}40\%$.

Drehung in 65 proz. Alkohol:

$$[\alpha]_{21}^{D} = -20{,}4^\circ$$
$$(c = 1{,}467,\ l = 2,\ \alpha = -0{,}60^\circ).$$
$$[\alpha]_{23}^{D} = -20{,}0^\circ$$
$$(c = 1{,}200,\ l = 2,\ \alpha = -0{,}48^\circ).$$

IV. Rohrzucker-mono-phosphorsaures Strychnin

wird durch Umsetzung von Calcium-saccharophosphat (Hesperonal-calcium von *E. Merck*, Darmstadt) mit äquivalenten Mengen Strychnin und Oxalsäure dargestellt. 6,682 g Strychnin werden in 300 ccm heißem Wasser unter Zusatz von 20 ccm n-Oxalsäure gelöst und noch warm zu einer Lösung von 6,0 g Hesperonal-calcium in 100 ccm Wasser gegeben. Nach Zusatz von 100 ccm Alkohol wird durch Macherey-Papier gegossen und dann das Filtrat wie üblich in vacuo eingeengt, wobei sich meistens einige feste Krystalle von Strychnin abscheiden. Beim Stehen und energischen Anreiben, besser auf Zusatz einiger Impfsplitter, erstarrt der dickflüssige Eindampfrückstand zu einem Brei von feinen weißen Blättchen, die aus wäßrigem Aceton umkrystallisiert und so in kleinen derben Nadeln erhalten werden; sie schmelzen bei etwa 185° unter Gelbfärbung und allmählicher Zersetzung. Das rohrzucker-monophosphorsaure Strychnin ist schwer löslich in absolutem Alkohol und unlöslich in Aceton wie in Äther; in Wasser erleidet es hydrolytische Dissoziation, die durch Zusatz von Alkohol oder Aceton zurückgedrängt werden kann. Zufälligerweise zeigte die Substanz praktisch keine Drehung. Sie enthielt 6 Mol. Krystallwasser, die wie bei den voraufgehend beschriebenen ähnlichen Verbindungen durch Erwärmen im Vakuum abgegeben und dann in Berührung mit der Atmosphäre wieder angezogen werden.

0,3032 g Substanz verloren 0,0266 g H_2O.

Wiederaufnahme 0,0265 g H_2O.

0,2893 g Substanz gaben 0,0281 g $Mg_2P_2O_7$.

0,1470 g Substanz entwickelten 6,45 ccm N (18° und 746 mm).

$(C_{21}H_{22}N_2O_2)_2 \cdot C_{12}H_{23}O_{14}P + 6\,H_2O$:

Ber. $H_2O = 9{,}02\%$; $P = 2{,}60\%$; $N = 4{,}68\%$;

gef. $H_2O = 8{,}77\%$; $P = 2{,}70\%$; $N = 4{,}94\%$.

Damit sind von der hier behandelten Klasse biochemisch wichtiger Kohlenhydrat-ester-säuren wohl gekennzeichnete krystallisierte Salze bekannt geworden.

Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Hunderteinunddreißigster Band

Drittes und viertes Heft

Ausgegeben am 11. August 1922



Berlin

Verlag von Julius Springer

1922

Die **Biochemische Zeitschrift**

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des laufenden Bandes im Umfange von 40 Bogen beträgt M. 360.—.

Der für diese Zeitschrift berechnete Bandpreis hat seine Gültigkeit nur während der Dauer des Erscheinens. Der Verlag muß sich bei der Unsicherheit der Entwicklung der wirtschaftlichen Verhältnisse vorbehalten, den zurzeit geltenden Preis nach Abschluß des Bandes zu erhöhen.

Die Biochemische Zeitschrift ist durch jede Buchhandlung sowie durch die unterzeichnete Verlagsbuchhandlung zu beziehen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens 2 Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Redakteur,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Die Verfasser erhalten 100 Sonderabdrücke ihrer Abhandlungen kostenfrei, bis zu einem Umfang von $1^1/_2$ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur 75, weitere gegen Berechnung. Für den 16 seitigen Druckbogen wird ein Honorar von M. 40.— gezahlt.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer
Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

131. Band. **Inhaltsverzeichnis.** Heft 3/4.

Ein Beitrag zur Kenntnis der proteolytischen Enzyme des Malzes.

Von

Harry Lundin.

(Aus dem Zentrallaboratorium der A.-G. Stockholmer Brauereien.)

(Eingegangen am 15. April 1922.)

Mit 15 Abbildungen im Text.

Für den Vermälzungsprozeß sind die Veränderungen, welche in den stickstoffhaltigen Verbindungen der Gerste, die unter dem Kollektivnamen „Eiweißstoffe" zusammengefaßt werden, eintreten, von der größten Bedeutung. Mit Hinblick auf die lokalen Vorkommnisse der Eiweißstoffe im Korne können sie auf folgende Weise eingeteilt werden:

a) Physiologische oder Reserveeiweißstoffe, die in den Außenrändern des Endosperms des Kornes unmittelbar unter der Aleuronschichte gelagert sind. Den wechselnden Eiweißgehalt des Kornes muß man zum größten Teil einer ungleichen Mächtigkeit dieser Eiweißschichte zuschreiben. Bei der Vermälzung spalten sich in erster Linie diese Eiweißstoffe und die dabei gebildeten Produkte dienen teils als Nahrung für den Wurzelkeim, teils werden sie im Korne abgelagert, um dann während des Maischprozesses in Würze überzugehen.

b) Histologische Eiweißstoffe, die sich zwischen den stärkeführenden Zellen des Endosperms befinden und das Stärkekorn umschließen. Diese werden langsamer von den proteolytischen Enzymen angegriffen, verändern sich nicht so stark und bilden im wesentlichen zusammen mit den Eiweißstoffen der Aleuronschichte die in Wasser unlöslichen Proteine des Malzes.

c) Eiweißstoffe der Aleuronschichte, die keine Rolle bei der Umsetzung im Korne spielen, da sie in unveränderter Form in die Treber übergehen.

Die Hauptmenge der im Gerstenkorne vorkommenden Eiweißstoffe ist hochmolekular und unlöslich. Bei der Vermälzung sollen sie (die physiologischen und histologischen) durch eine Anzahl von proteolytischen Enzymen teilweise löslich gemacht und hydrolysiert werden. Das Resultat von deren Wirksamkeit bilden eine Anzahl von in

verschiedenen Hydrolysierungsstadien befindlichen Eiweißderivaten, Albumosen, Peptone, Polypeptide, Aminosäuren und Ammoniak.

Die proteolytischen Enzyme treten sogleich bei Beginn des Mälzens im Endosperm des Kornes in Wirksamkeit. Zum Teile kommen sie schon fertig im Korne vor, aber in der Hauptsache werden sie beim Keimen gebildet. Es gibt Eiweißenzyme von hydrolysierendem wie von synthetisierendem Charakter. Was die letztgenannten betrifft, so ist unsere Kenntnis von ihnen sehr gering. Vorliegende Untersuchung behandelt nur die eiweißspaltenden Enzyme, Peptase und Tryptase, in Grünmalz, in fertigem Malz und in Malzkeimen, sowie ihr Verhalten bei Autolyse dieser drei Substanzen.

Um Ergebnisse zu bekommen, die direkt auf die praktische Mälzarbeit anwendbar sind, ist nicht mit gereinigten oder konzentrierten Enzympräparaten gearbeitet worden, sondern anstatt dessen wurde als Enzymsubstrat auf der Seck-Mühle fein gemahlenes Mehl von Grünmalz, resp. von Malz oder Malzkeimen oder Wasserextrakt davon angewendet.

Was die Versuche mit Grünmalz betrifft, so wurde in ein paar Fällen der Wasserextrakt von auf einer Fleischmaschine zerriebenen Proben fünf bis sechs Tage alter Haufen verwendet, aber im allgemeinen kam nur auf der obersten Horde der Darre (Maximaltemperatur ungefähr 50° C) getrocknetes Grünmalz vom Pilsner Typus zur Anwendung. Diese wurden samt den daransitzenden Keimen fein gemahlen und das erhaltene Mehl direkt verwendet. Bei den Malzversuchen wurde Pilsnermalz (von Schonischer Gerste) genommen. Die verwendeten Malzkeime stammen von einer Pilsnermalzerzeugung und haben den ganzen Darrprozeß durchgemacht.

I. Autolyseversuche.

Als Maß für die Autolyse wurde (übereinstimmend mit *K. G. Dernbys* entsprechenden Untersuchungen mit Hefe, diese Zeitschrift **81**. **1917**) die Hydrolyse der Peptidbindung (-CONH-) gewählt, indem die Menge des neugebildeten Aminostickstoffes mit *Sörensens* Methode der Formoltitrierung verfolgt wurde. Mit dieser Methode erhält man jedoch keinen exakten Ausdruck des Autolysenverlaufes, da der Formolstickstoff nur die Wirksamkeit der Tryptase direkt indiziert und bloß indirekt die der Peptase. Aus diesem Grunde wurden daher ergänzende Versuche mit eingehendem Studium der gebildeten Autolyseprodukte ausgeführt.

A. Grünmalz.

Bei den unten folgenden Versuchen wurde Grünmalz von Pilsnertypus angewendet, das auf der obersten Horde in der Darre getrocknet worden war (Maximaltemperatur ca. 50°). Das Malz wurde mit daran-

sitzenden Wurzelkeimen auf der Seckmühle fein gemahlen und das erhaltene Mehl dann direkt bei den Versuchen angewendet.

Bei der Eiweißautolyse werden hochmolekulare Eiweißverbindungen allmählich bis zu Aminosäuren und Ammoniak gespalten. Dieses Phänomen begleitet eine Änderung (Verminderung) der Wasserstoffionenkonzentration, weshalb man Puffersubstanzen zusetzen muß, wenn man die Autolyse bei konstantem p_H-Wert durchführen will. In diesem Falle sind Phosphatmischungen angewendet worden.

In Becherkolben von 80 ccm wurden 12 g Malzmehl gewogen, hierauf destilliertes Wasser, Salzsäure resp. Natriumhydrat, Kochsalzlösung und Phosphatmischung zugesetzt. Salzsäure und Natriumhydrat wurde in solchen Mengen angewendet, daß sie laut Vorversuchen den Malzlösungen die gewünschte Wasserstoffionenkonzentration gaben (siehe Tabelle I). Was die Phosphatgemenge betrifft, so bestanden sie aus in solchen Verhältnissen und Mengen gemischten $^1/_5$ molaren Lösungen von KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 (Totalvolumen 25 ccm), daß nach Verdünnung auf das Volumen der Versuchslösung die gewünschte Wasserstoffionenkonzentration erhalten wurde. Die Kochsalzlösung wurde in solcher Menge zugesetzt, daß die totale Chlorionenkonzentration in allen Kolben dieselbe war. Dies, um eine eventuelle Einwirkung dieser Ionen auf den Hydrolyseverlauf auszuschalten. Das in jeden Kolben gegebene Flüssigkeitsvolumen machte genau 70 ccm aus.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, wurden 4 Serien Kolben, I, II, III und IV, mit 10 Kolben in jeder Serie angewendet. Innerhalb jeder Serie variierte die Wasserstoffionenkonzentration übereinstimmend mit den in der Tabelle angegebenen Werten. Die Kolben wurden im Wasserbad auf 37° erwärmt, oft umgeschüttelt und dann in den Thermostaten (37—39°) gesetzt. Nach 10 Stunden wurde Serie I, nach 22 Stunden Serie II usw. herausgenommen. Aus den herausgenommenen Kolben wurden unmittelbar nach vorhergehendem Umschütteln 15 oder 20 ccm Lösung abpipettiert und in entsprechende Meßkolben von 50 ccm überführt, welche sogleich zwecks Vernichtung der Enzyme 15 Minuten lang ins kochende Wasserbad gehalten wurden, worauf nach vorheriger Ausfällung der Phosphate der formoltitrierbare Stickstoff bestimmt wurde. Die Methodik hierbei war folgende:

Zu den Lösungen in den Meßkolben wurde 1—2 g Bariumchlorid zugesetzt und, nachdem dieses sich gelöst hatte, soviel kaltes, gesättigtes Bariumhydrat, daß ein hineingeworfenes Stück rotes Lackmuspapier tiefblau gefärbt wurde. Phosphate und Carbonate wurden hierbei quantitativ gefällt. Die Kolben wurden nun mit destilliertem Wasser bis zum Strich gefüllt, gut umgeschüttelt und 20 Minuten stehen gelassen, hierauf filtriert. In den Filtraten wurde der Formolstickstoff unter Anwendung von *Lüers* Colorimeter (diese Zeitschr. **114**. 1920) bestimmt. Bei der Titrierung von Aminosäuren kam 0,1 n-Lauge zur Anwendung. Man kann mit Leichtigkeit bis zu 0,05 ccm genau ablesen, was einigen $^1/_{10}$-Proz. des totalen Stickstoffs entspricht.

Die in der Tabelle für die Zeit von 0 Stunden angegebenen Werte an formoltitrierbarem Stickstoff wurden auf folgende Weise erhalten: 30 g auf einer Seckmühle fein gemahlenes Grünmalz wurden langsam $^1/_2$ Stunde lang mit 70 ccm 96 proz. Alkohol im Wasserbad von 80—85° unter ständigem Umrühren gekocht, wobei der größte Teil des Alkohols sich verflüchtigte und eine halbfeste Masse zurückblieb. Die Temperatur des Wasserbades wurde auf 100° erhöht und unter kräftigem Umrühren der Masse verschwand der letzte Alkoholrest. Nach Abkühlung wurden 300 g destilliertes Wasser von Zimmertemperatur und einige

Tropfen Toluol zugesetzt. Unter oft wiederholtem Umrühren wurde das Mehl bei dieser Temperatur 3 Stunden extrahiert und dann nach Ausfällung der Phosphate die Formoltitrierung ausgeführt (*Langkammerer* und *Leberle*, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 1919). Da die Enzyme bei der Alkoholbehandlung vollständig vernichtet worden war, repräsentiert also das erhaltene Resultat den Gehalt des Ausgangsmateriales an Formolstickstoff.

Bei diesen Autolyseversuchen wurde stets Chloroform (0,2—0,3 ccm per Kolben) als Antisepticum verwendet. Die Fälle, wo p_H 2,6 und 3,7 beträgt (siehe Tabelle), liegen außerhalb des Wirkungsgebietes der Phosphatgemenge als Puffersubstanzen. Primäres Phosphat ist hier aber doch auch zugesetzt worden, um eine Übereinstimmung mit den übrigen Versuchen zu erzielen. Der totale Stickstoffgehalt des Grünmalzes ist nach *Kjeldahl* bestimmt worden. Bei Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration kam, je nach den Umständen, sowohl die elektrometrische wie die colorimetrische (mit *Clark* und *Lubs* Indikatoren) Methode zur Anwendung.

Tabelle I.

a ccm 0,2 n-HCl + b ccm 0,2 n-NaOH + c ccm 0,2 n-NaCl + d ccm 0,2 m-KH_2PO_4 + e ccm 0,2 m-Na_2HPO_4 + H_2O = 70 ccm + 12 g Grünmalzmehl.

Stickstoffgehalt des Grünmalzes = 17,2 mg pro Gramm Malz.
Wassergehalt „ „ = 6,8%.
Temperatur = 37°.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
a =	14,0	9,0	6,5	5,0	4,0	2,0	0	0	0	0
b =	0	0	0	0	0	0	0	2,0	4,0	6.0
c =	0	5,0	7,5	9,0	10,0	12,0	14,0	14,0	14,0	14.0
d =	25,0	25,0	25,0	24,5	24,2	23,0	20,0	13,5	10,5	3,0
e =	0	0	0	0,5	0,8	2,0	5,0	11,5	14,5	22.0
p_H =	2,6	3,6	4,1	4,4	4.8	5,5	6,1	6,5	6,8	7.5
Autolysezeit	**% gebildeter Formolstickstoff**									
0 Std.	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7.4
Serie I: 10 „	—	12.3	—	13,5	13,1	12,0	11,6	10,7	10.6	9.2
„ II: 22 „	7,7	—	18.5	—	18,5	—	—	—	—	—
„ III: 35 „	9,2	—	23,1	23.8	23,1	—	—	18,2	—	—
„ IV: 70 „	—	31,9	33.9	39,0	33.9	31.2	29,4	27,8	25.9	23.7

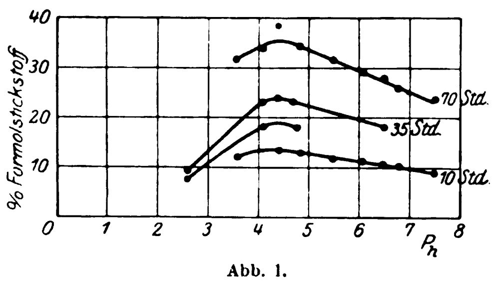


Abb. 1.

Die Versuchsresultate sind graphisch in Abb. 1, 2, und 3 dargestellt:

Aus Abb. 1 geht hervor, daß das Autolyseoptimum bei einer Wasserstoffionenkonzentration von etwa $10^{-4,5}$ liegt. Die Kurven geben die Relation zwischen dem gebildeten Formolstickstoff und dem Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration bei verschiedenen Autolysezeiten an. Vermindert sich p_H, so nimmt die Intensität der Autolyse rasch ab, um bei einem Wert von 2,0—2.5

so gut wie wegzufallen. Eine Erhöhung von p_H hat dagegen keine so nachteilige Einwirkung auf die proteolytischen Enzyme. Noch bei p_H 8,0 ist die Autolyse beachtenswert.

In Abb. 2 wurde die Autolysezeit, in Stunden ausgedrückt, als Abszissen und die Prozente gebildeten Formolstickstoffe als Ordinaten gewählt.

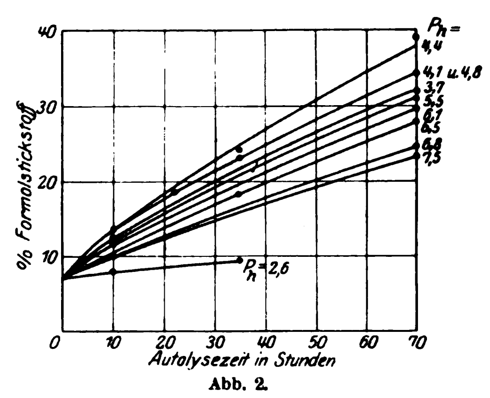


Abb. 2.

In Abb. 3 kann der Optimalpunkt mit größerer Genauigkeit bestimmt werden als in Abb. 1. Als Abszissen wurde der Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration gewählt und als Ordinaten die Zeit in Stunden, die bei den verschiedenen Versuchen erforderlich war, um 15, 20, 25, 30 und 35% der anwesenden Peptidverbindungen zu hydrolysieren. Man erhält parabelähnliche Kurven mit dem Vertex bei 4,3 bis 4,5, Zahlen, welche daher den Logarithmus der optimalen Wasserstoffionenkonzentration der Autolyse angeben.

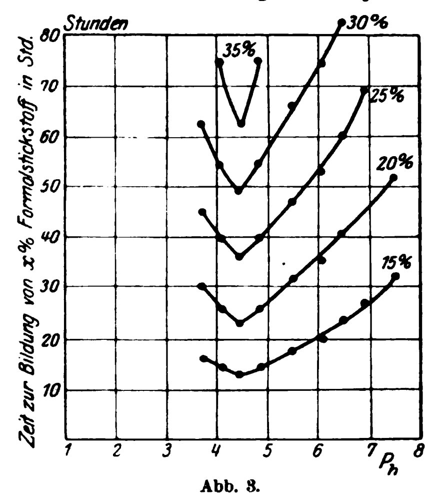


Abb. 3.

Bei diesem Versuche wurde der Autolysenverlauf dadurch studiert, daß die Neubildung der formoltitrierbaren Stickstoffverbindungen bestimmt wurde. Diese repräsentieren jedoch nur die letzten Stadien der Autolyse, weshalb die erhaltenen Werte keinen Anspruch machen können, ein vollständiges Bild von derselben zu geben.

Nach *H. Schjerning* (Meddelelser fra Carlsbergslaboratoriet, 1914) verläuft die Proteinspaltung bei der Vermälzung nach folgendem Schema:

Q →	A_{II} →	A_I →	P →	H → (T)	G →	Stickstoff wird bei der Entwicklung des Wurzelkeims entfernt.
Unlösliche Proteine	Albumin II	Albumin I	Pept. Spaltprod.	Amin-Amid	Ammoniak	

(H und G: Tryptische Spaltungsprodukte; A_{II} bis P: lösliche Eiweißstoffe)

Die im Gerstenkorne befindlichen Eiweißstoffe verwandeln sich über ein oder mehrere unbekannte Zwischenglieder teilweise in Albumin II (Edestin). Das im Korn schon vorher anwesende und das nach obigem während des Keimens gebildete Albumin II verwandelt sich weiter in Albumin I (Leukosin). Albumin I wird durch die Peptase in die peptischen Spaltungsprodukte (Denuclein + Albumosen + Pepton) abgebaut, die schließlich infolge Einwirkung der Tryptase in Aminosäuren und Ammoniak zerfallen.

Autolysenversuche bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration.

Unten wurde in drei verschiedenen Fällen, teils in saurer ($p_H = 3,1$ und 4,5) und teils in neutraler Lösung ($p_H = 6,8-7,2$) die Relation zwischen den bei der Autolyse gebildeten Produkten bestimmt: Albumine (nach *Schjerning*), Peptidverbindungen (Denuclein, Albumosen, Peptone) Aminosäuren und Ammoniak.

In drei Serien Becherkolben (250 ccm) mit drei Kolben in jeder Serie wurden Autolyseversuche angestellt, wie folgt:

Serie 1. In jedem Kolben 10,5 ccm 0,2 n-Salzsäure + 119.5 ccm Wasser + 13 g Malzmehl + 0,4 ccm Chloroform.

Serie 2. In jedem Kolben 5,0 ccm 0,2 n-Salzsäure + 125 ccm Wasser + 0,4 ccm Chloroform + 13 g Malzmehl.

Serie 3. In jedem Kolben 4,4 ccm 0,2 n-Natriumhydrat + 125,6 ccm Wasser + 0,4 ccm Chloroform + 13 g Malzmehl.

Bei diesen Versuchen wurde infolge Mangels an Grünmalz lichtes Pilsnermalz verwendet. In solchem Malz, das auf der oberen Darrhorde auf ca. 100° C erwärmt worden war, sind die proteolytischen Enzyme geschwächt (vgl. S. 209), aber im übrigen sind die Verhältnisse zum größten Teile vergleichbar.

Die Kolben wurden im Wasserbad bis auf 37° erwärmt und in den Thermostaten (37—39°) gesetzt. Nach Ablauf der in Tab. II angegebenen Zeiten wurden sie herausgenommen und filtriert. In den klaren Filtraten wurde bestimmt:

a) der totale Stickstoffgehalt nach *Kjeldahls* Methode in 10 ccm = a mg pro 100 ccm;

b) die Menge des Albuminstickstoffs = b mg pro 100 ccm;

15 ccm Filtrat wurde in einen 100 ccm-Meßkolben überführt und soviel 0,2 n-Natriumhydrat zugesetzt, daß die Lösung auf Lackmus neutral reagierte, worauf 5 ccm $CaCl_2$-Lösung (10 proz.) und 10 ccm nach *H. Schjerning* (Meddelelser fra Carlsberglaboratoriet **11**. 1914) hergestellte Stannochloridlösung unter Umschütteln zugeschüttet wurden. Der Meßkolben wurde mit Wasser bis zum Strich gefüllt, bis zum nächsten Tag stehen gelassen und dann filtriert. In 30 ccm des erhaltenen Filtrates wurde der Stickstoffgehalt nach *Kjeldahl* bestimmt. Aus den gewonnenen Analyseresultaten kann die Menge der durch Stannochlorid fällbaren Eiweißstoffe, Albumine, berechnet werden.

c) die Summe von Amino- und Ammoniakstickstoff nach der Formolmethode in 15 ccm = c mg pro 100 ccm;

d) der Ammoniakstickstoff in 15 ccm nach *Folins* Methode = d mg pro 100 ccm.

Die in der Tabelle II (S. 10) für den „Peptidstickstoff" angegebenen Werte, der den Stickstoffgehalt der anwesenden Denucleine, Albumosen und Peptone umfaßt, wurden als die Differenz $a - (b + c)$ berechnet.

Bei Betrachtung der Kurven (Abb. 4) zu den Versuchen I und III, wo der totale Stickstoffgehalt des Filtrates ungefähr gleich ist, finden wir einen beachtenswerten Unterschied im Verlauf der Autolyse. Beim Versuch I, wo die Autolyse in saurer Lösung vor sich ging, nimmt der Albuminstickstoff rasch ab und nähert sich 0, während er sich beim Versuch III, in neutraler Lösung, die ganze Zeit ungefähr konstant hält. Betreffs des Peptidstickstoffs sind die Verhältnisse gerade entgegengesetzt. Und gehen wir schließlich zum Aminostickstoff, so finden wir, daß er sich bei beiden Versuchen kräftig unter der Autolyse vermehrt, in Versuch III jedoch mit beträchtlich größerer Geschwindigkeit.

Dies zeigt deutlich, daß in saurer Lösung hauptsächlich ein pepsinähnliches Enzym arbeitet, das die hochmolekularen Eiweißstoffe des Malzes in Albumosen und Peptone spaltet, während in neutraler Lösung hauptsächlich ein trypsin- oder erepsinähnliches Enzym wirksam ist, das zwar nicht die oben genannten hochmolekularen Eiweißstoffe, wohl aber die schon pepsingespaltenen in Polypeptide und Aminosäuren spaltet.

Bei der optimalen Autolyse, die im Versuch II veranschaulicht wird, arbeiten wahrscheinlich diese Enzyme mit derselben Intensität.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß der Autolyseverlauf im Malz ein Resultat der Wirksamkeit mindestens zweier verschiedener Enzyme ist.

Die Ammoniakbildung scheint bei der Malzautolyse eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die in der Tabelle angegebenen Werte, die sehr unsicher sind, sind in den Versuchen II und III am höchsten und scheinen anzugeben, daß die Ammoniakbildung desto lebhafter wird, je mehr man die Autolysezeit ausdehnt.

Nachdem die optimale Malzautolyse in den Beharrungszustand gekommen ist, sind 75—80% der anwesenden Eiweißstoffe in die lösliche Form übergegangen und zwar 60% davon in der Amin-Amidform.

Betreffs der Einwirkung der Neutralsalze auf die Autolyse siehe Seite 218.

Tabelle II.

Die Autolyseprodukte des Malzes bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. Die Ziffern geben den Stickstoffgehalt der gebildeten Verbindungen in Prozenten des totalen Stickstoffgehaltes des Malzes an.

0,2 n-HCl resp. 0,2 n-NaOH + H_2O. . . = 130 ccm + 13 g Malzmehl.
Gehalt an Formolstickstoff des Malzmehls = 6,9% des totalen Stickstoffgehaltes.
Stickstoffgehalt des Malzmehls . . . . = 14 mg pro Gramm Malz.
Wassergehalt des Malzmehls . . . . . = 8,2%.
Temperatur = 37°.

Autolysezeit		p_H	Total-N im Filtrat	Albumin-N	Peptid-N	Amino-N	Ammoniak-N	Amino-N + Ammoniak-N
Serie I	18 Std.	3,1	42,8	4,5	29,3	9,0	0	9,0
	100 „	3,1	50,6	0,5	28,5	20,6	1,0	21,6
	200 „	3,1	53,4	0,9	28,0	23,5	1,0	24,5
„ II	18 „	4,4	57,3	3,4	29,3	24,6	0	24,6
	100 „	4,4	71,6	3,5	27,8	39,3	1,0	40,3
	200 „	4,4	74,7	4,2?	26,1	41,3	2,5	43,8
„ III	18 „	6,8–7,1	42,8	5,3	27,0	10,5	0	10,5
	100 „		54,3	4,2	22,5	25,6	2,0	27,6
	200 „		55,7	5,6	16,9	29,2	4,0	33,2

Abb. 4.

B. Malzkeime.

Bei den unten folgenden Versuchen wurden Malzkeime von Pilsner Malz angewendet. Diese hatten den ganzen Darrprozeß durchgemacht und waren daher bis etwa 100° C bei niedrigem Wassergehalt erhitzt gewesen.

In Becherkolben von 250 ccm wurden 10 g auf einer Seckmühle fein gemahlene Malzkeime gewogen, dann destilliertes Wasser, 0,2 n-HCl resp. 0,2 n-NaOH, 0,2 n-NaCl-Lösung und Phosphatmischung zugesetzt nach Tabelle III. Das gesamte zugesetzte Flüssigkeitsvolumen betrug überall 200 ccm, davon 50 ccm Phosphatmischung. Die Kolben wurden wie oben auf 37° erwärmt und in den Thermostaten gesetzt, hierauf wie früher der formoltitrierbare Stickstoff nach den in der Tabelle angegebenen Zeiten bestimmt.

Tabelle III.

a ccm 0,2 n-HCl + b ccm 0,2 n-NaOH + c ccm 0,2 n-NaCl + d ccm 0,2 m-KH_2PO_4 + e ccm 0,2 m-Na_2HPO_4 + H_2O = 200 ccm + 10 g Malzkeimmehl.

Stickstoffgehalt der Malzkeime = 37,7 mg pro Gramm Malzkeim.
Wasserhalt „ „ = 9,8%.
Temperatur = 37°.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
a =	23,0	17,0	12,0	5,0	0	0	0	0	0	0
b =	0	0	0	0	0	0	5,0	9,0	12,0	17,0
c =	0	6,0	11,0	18,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0
d =	50,0	49,0	48,7	47,2	40,0	33,0	26,0	10,5	6,4	2,0
e =	0	1,0	1,3	2,8	10,0	17,0	24,0	39,5	43,6	48,0
p_H =	3,9	4,3	4,7	5,3	6,0	6,3	6,7	7,2	7,4	7,9
Autolysezeit	% gebildeter Formolstickstoff									
0 Std.	12,9	12,9	12,9	12,9	12,9	12,9	12,9	12,9	12,9	12,9
19 „	20,2	23,1	25,5	27,4	27,8	28,5	28,0	28,5	26,9	24,5

Als Antiseptikum diente 0,2 ccm Chloroform. Eine solche Menge vermag die Flüssigkeit nicht länger als höchstens 20 Stunden steril zu halten. Nach dieser Zeit tritt nämlich kräftige Säuerung ein. Der Zusatz

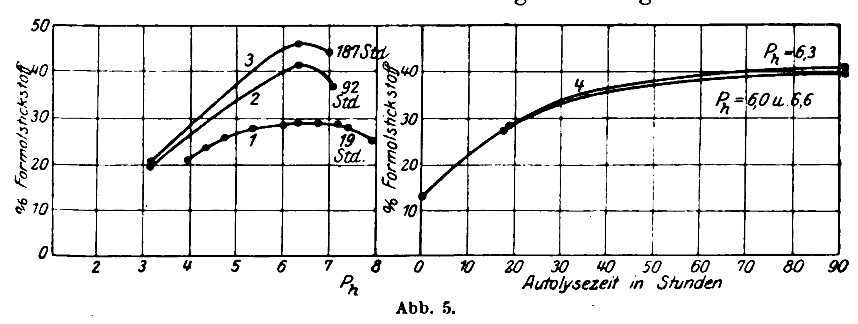


Abb. 5.

von mehr Chloroform (0,6 ccm) unterdrückt die Enzymwirksamkeit fast vollständig. Dies veranlaßte, daß die Versuche nicht über 20 Stunden ausgedehnt wurden. In der Tabelle III sind die Versuchsresultate

angegeben. Wiederholte Versuche gaben ähnliche Werte. Die Werte für den formoltitrierbaren Stickstoff bei 0 Stunden wurden wie oben (s. S. 195) bei Malz gewonnen (15 g feingemahlene Malzkeime wurden mit Alkohol behandelt und hierauf mit 300 ccm destilliertem Wasser extrahiert).

Die Kurve 1 in Abb. 5 illustriert den Versuch. Die Kurven 2 und 3 resultieren aus der Kolonne „Amino- und Ammoniakstickstoff" in Tab. IV, S. 202. Das Autolyseoptimum liegt bei einer Wasserstoffionenkonzentration von p_H ca. 6,3. Die Kurve 4 zeigt die Relation zwischen Autolysezeit und dem gebildeten Formolstickstoff bei diesem p_H-Wert.

Bei Vergleich der Autolyse in Malz und in Malzkeimen finden wir einen beträchtlichen Unterschied in der optimalen Wasserstoffionenkonzentration: p_H ca. 4,4, resp. p_H ca. 6,3.

Die Autolyseprodukte bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration.

Auf dieselbe Weise wie erst bei Malz wurden unten bei Malzkeimen die verschiedenen Autolyseprodukte bei drei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen zum Gegenstande eines eingehenden Studiums gemacht.

Tabelle IV.

Die Autolyseprodukte der Malzkeime bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration.

0,2 n-HCl, resp. 0.2 n-NaOH + 40 ccm Phosphatlösungen + H_2O = 130 ccm + 6 g Malzkeimmehl.
Stickstoffgehalt des Malzkeimmehles. . . = 37,7 mg pro Gramm.
Formolstickstoffgehalt des Malzkeimmehles = **12,9%** des totalen Stickstoffgehaltes.
Wassergehalt des Malzkeimmehles. . . . = 9,8%.
Temperatur = 37°.

Autolysezeit		p_H	Total-N im Filtrat	Albumin-N	Peptid-N	Amino-N	Ammoniak-N	Amino-N + Ammoniak-N
Serie I	18 Std.	3,1	54,8	4,3	34,7	15,8	0	15,8
	92 „	3.1	57,0	4.1	34.3	18.6	0	18.6
	187 „	3.1	59.5	4.4	35.8	19.3	0	19.3
„ II	18 „	6.1—6.5	57,6	1.6	29.1	24,9	2.0?	26.9
	92 „		67.1	1.8	24,5	38.2	2.6	40.8
	187 „		68.9	2.6	20.5	42.2	3.6	45.8
„ III	18 „	6.7—7.3	54.5	3.1			1,0	
	92 „		60,5	3,3	22,3	33.1	1.8	34,9
	187 „		65.1	3.4	17,5	38.6	5.6	44.2

3 Serien Becherkolben mit 3 Kolben in jeder Serie: Serie I: 70 ccm H_2O + 40 ccm 0,2 m-KH_2PO_4 + 20 ccm 0,2 n-HCl + 6 g Malzkeimmehl + 0,4 ccm Chloroform. $p_H = 3,1$. Serie II: 90 ccm H_2O + 40 ccm 0,2 m-Phosphatlösungen + 6 g Malzkeimmehl + 0,4 ccm Chloroform. $p_H = 6,1—6,5$. Serie III: 85 ccm H_2O + 40 ccm 0,2 m-Phosphatlösungen + 5 ccm 0,2 n-NaOH + 6 g Malzkeimmehl + 0,4 ccm Chloroform. $p_H = 6,7—7,3$.

Die Kolben wurden auf 37° erwärmt und in den Thermostaten gesetzt. Nach den in der Tabelle angegebenen Zeiten wurden dieselben Untersuchungen aus-

geführt wie oben bei Malz. In den beiden letzten Serien zeigten die Lösungen nach einiger Zeit Neigung sauer zu werden, weshalb von Zeit zu Zeit 0,2 n-NaOH zugesetzt werden mußte. Dies war der Grund dafür, daß die Wasserstoffionenkonzentration nicht auf einem bestimmten Wert gehalten werden konnte (die erforderlichen p_h-Bestimmungen wurden ausgeführt, indem zu ungefähr 0,5 ccm Lösung etwas Bromthymolblau getropft wurde).

Aus Tabelle IV und den Kurven in Abb. 6 ersieht man, daß es in Malzkeimen kein Enzym gibt, das in saurer Lösung wirkt. Versuch I

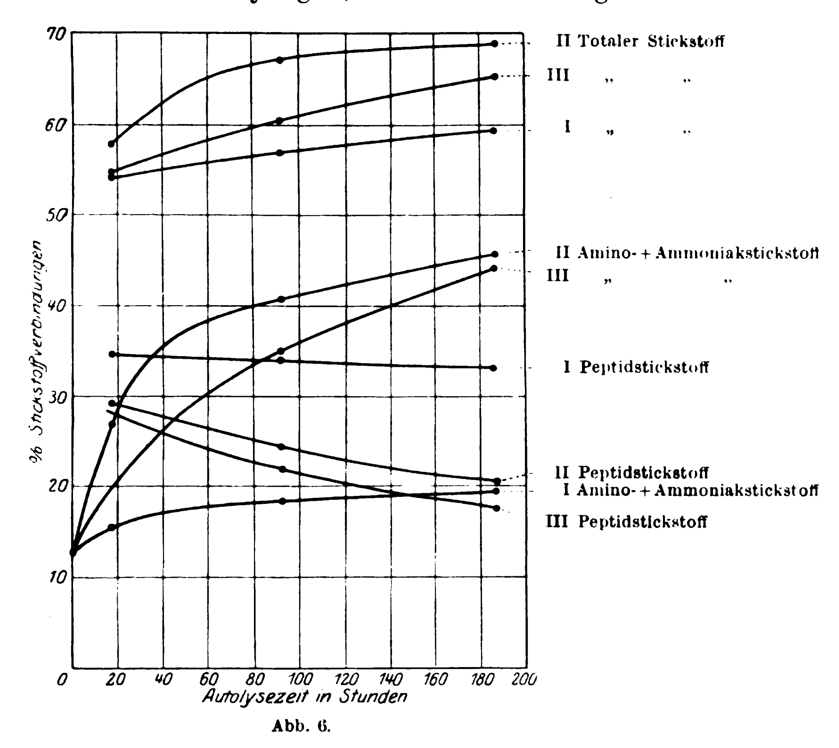


Abb. 6.

liegt fast ganz außerhalb des Wirksamkeitsgebietes der Malzkeimenzyme, was daraus hervorgeht, daß die Mengen der verschiedenen Spaltungsprodukte sich während der Versuchszeit nur wenig ändern. Bei der Malzkeimautolyse scheinen keine pepsinähnlichen Enzyme mitzuwirken.

Bei Betrachtung des Versuches II, der im Optimumgebiet der Autolyse ausgeführt wurde, finden wir eine kräftige Steigerung des Formol- und eine entsprechende Verminderung des Peptidstickstoffs. Daneben hat gegenüber I der Albumingehalt bedeutend abgenommen. Hieraus und aus unten mitgeteilten Versuchen können wir den Schluß ziehen, daß in Malzkeimen trypsinähnliche Enzyme vorkommen, die, im Gegensatz zu den entsprechenden Malzenzymen, auch die hochmolekularen Eiweißkörper des Malzkeimes spalten.

Gehen wir schließlich zu Versuch III über, so finden wir, daß der Albumingehalt höher als in II ist. Die Spaltungsfähigkeit der Autolyseenzyme ist Albuminen gegenüber hier also herabgesetzt. Betrachten wir dagegen den Peptidstickstoff, so sehen wir, daß er niedrigere Werte aufweist als bei II und daß der Formolstickstoff in entsprechendem Grade sich vermehrt hat, so daß er trotz des niedrigeren totalen Stickstoffgehaltes des Filtrats doch fast denselben Wert wie in Versuch II erreicht. Dies scheint zu zeigen, daß die Autolyse nicht bloß ein Ergebnis der oben erwähnten trypsinähnlichen Enzyme ist, sondern daß daran auch nur peptidspaltende Enzyme teilnehmen, z. B. erepsinähnliche, welche optimal in einer schwach alkalischen Lösung arbeiten.

Was die Ammoniakbildung betrifft, so sind die Analysenresultate zu unsicher, um bestimmte Schlußfolgerungen zuzulassen. Hier wie bei der Malzautolyse wird diese Abspaltung möglicherweise von besonderen Enzymen, Desamidasen, vermittelt.

Betreffs der Einwirkung der Neutralsalze s. S. 218.

Um eine bessere Übersicht über die Wirksamkeit der Enzyme bei den in Tabelle II und IV mitgeteilten Autolyseversuchen zu bekommen, ist der Stickstoffgehalt der Spaltungsprodukte bei einer Autolysezeit von 200, resp. 187 Stunden in Prozente des totalen Stickstoffgehaltes des Filtrates umgerechnet worden.

Tabelle V.

Zeit	Malzautolyse			Summe des N-Gehaltes der Spaltungsprodukte = b + c	$\frac{100 \cdot c}{b + c}$	p_H
	a	b	c			
	Albumin-N	Peptid-N	Amino-N + Ammoniak-N			
Serie I: 200 Std.	1,7	52,4	45,9	98,3	46,6	3,1
„ II: 200 „	5,7	35,2	59,1	94,3	62,7	4,4
„ III: 200 „	10,1	30,3	59,6	89,9	66,3	6,8—7,1

Die Werte in Tabelle V für Albumin und für die Summe der Spaltungsprodukte illustrieren die in saurer Lösung wirksame Malzpeptase.

Tabelle VI.

Zeit	Malzkeimautolyse			Summe des N-Gehaltes der Spaltungsprodukte = b + c	$\frac{100 \cdot c}{b + c}$	p_H
	a	b	c			
	Albumin-N	Peptid-N	Amino-N + Ammoniak-N			
Serie I: 187 Std.	7,4	60,2	32,4	92,6	35,0	3,1
„ II: 187 „	3,7?	29,8	66,5	96,3	69,1	6,1—6,5
„ III: 187 „	5,2	26,9	67,9	94,8	71,6	6,7—7,3

Die vorletzte Kolonne gibt den gebildeten Formolstickstoff in Prozenten der Summe des Stickstoffgehaltes der Spaltungsprodukte an und indiziert somit die Tryptase des Malzes, die in schwach saurer oder neutraler Lösung arbeitet. Tabelle VI bestätigt, was auf S. 15 dargelegt wurde. Aus dem niedrigen Gehalt an „Peptid"-Stickstoff und dem hohen Formolstickstoffwerte in Prozenten der totalen Menge der Spaltungsprodukte in Serie III kann man die Existenz eines möglicherweise erepsinähnlichen Enzyms in den Malzkeimen vermuten (da die Versuchsfehler 1 bis 2% ausmachen, müssen die Resultate mit Vorsicht beurteilt werden).

Aus Abb. 4 und 6 wie aus obigen Tabellen geht hervor, daß der optimale Autolyseverlauf bei Malz und bei Malzkeimen relativ übereinstimmt. Der totale Gehalt an in Lösung gehenden Stickstoffverbindungen ist im erstgenannten Falle etwas größer, aber die gebildeten peptischen Autolyseprodukte spalten sich lang nicht so weit wie im letzterem Falle.

Aus den erzielten Resultaten geht deutlich hervor, daß in Malz und in Malzkeimen eine Anzahl verschiedener proteolytischer Enzyme vorkommen, Peptasen, Tryptasen sowie eventuell Ereptasen und Desamidasen. Die letztgenannten scheinen eine sehr untergeordnete Rolle zu spielen. Bei der Malzautolyse sind die peptischen Enzyme stark neben den tryptischen vertreten, wogegen die Malzkeimautolyse ein Resultat von in überwiegendem Grade tryptischen Enzymen zu sein scheint.

Um die in Malz und in Malzkeimen vorkommenden Enzyme von Peptase- oder Tryptasecharakter näher zu untersuchen, wurden unten Versuche so angeordnet, daß Enzymsubstrat oder Enzymlösungen mit Eiweißstoffen von verschiedenen Hydrolysegrad, Acidalbumin, Gelatine und *Witte*-Pepton, reagieren gelassen wurde, wobei die Wasserstoffionenkonzentration für die Wirksamkeit der verschiedenen Enzyme in jedem Fall bestimmt wurde, mit anderen Worten, es wurden Versuche angestellt, um die Wirksamkeit der verschiedenen Enzyme zu isolieren.

Auf diese Weise ist konstatiert worden, daß a) im Malz vorkommt:

1. Malzpeptase (eine oder mehrere), die in löslichen Eiweißstoffe des Malzes und Gelatine, nicht aber Eialbumin, in Albumosen und Peptone spaltet. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration für diese Reaktion liegt bei Malz bei p_H 3,7—4,3 und bei Grünmalz bei p_H 3,2.

2. Malztryptase (eine oder mehrere), die weder die hochmolekularen Eiweißstoffe des Malzes noch Eialbumin noch Gelatine, wohl aber deren peptische Spaltungsprodukte sowie *Witte*-Pepton, wenn auch unvollständig, in Polypeptide und Aminosäuren spaltet. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration ist p_H 6,1—6,4 (Grünmalz spaltet *Witte*-Pepton).

b) In Malzkeimen Malzkeimtryptase (eine oder mehrere) vorkommt, die die löslichen Eiweißstoffe des Keimes (aber nicht Eialbumin), Gelatine und Witte-Pepton in Polypeptide und Aminosäuren spaltet. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration ist p_H 6,2—6,4 (Gelatinespaltung p_H 6,4—7,3).

Die Autolyse ist bei Malz und bei Malzkeimen ein Resultat der Arbeit verschiedener proteolytischer Enzyme und verläuft nur bei einer solchen Wasserstoffionenkonzentration, die deren gleichzeitige Wirksamkeit zuläßt. Bei Malz tritt die Autolyse bei einer Wasserstoffionenkonzentration ein, die in der Mitte zwischen der der Peptase und der der Tryptase liegt. Eine kleine Veränderung in der Wasserstoffionenkonzentration muß einen großen Unterschied in der Autolyseschnelligkeit hervorrufen, da hierdurch der aktive Teil eines der Enzyme vermehrt wird, wogegen bei den übrigen eine Verminderung eintritt. Bei der optimalen Autolyse ist nur ein Teil eines jeden Enzyms aktiv, was erklärt, daß für die vollständige Autolyse ungefähr 10 Tage erforderlich sind.

Schjerning gibt an (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, 9), daß die maximale Proteolyse bei Wasserstoffionenkonzentrationen verläuft, die größer sind als $0{,}122 \cdot 10^{-5}$ und die minimale bei solchen, geringer als $0{,}122 \cdot 10^{-6}$. *L. Adler* (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen, 1917, S. 129) hat die gleichzeitige Wirksamkeit bei Peptase und Tryptase in Malz bestimmt und gefunden, daß der größte Effekt zwischen p_H 4,3 und 5,0 eintritt.

K. G. Dernby (loco cit.) hat gefunden, daß die optimale Wasserstoffionenkonzentration für die Autolyse bei untergäriger Brauereihefe bei einem Wert von 10^{-6} liege.

Unten werden die Bezeichnungen Peptase und Tryptase in kollektiver Bedeutung gebraucht werden, wenn mehrere gleichartige Enzyme von Peptase- oder Tryptasecharakter vorkommen.

II. Malzpeptase.

Peptische Malzenzyme wurden durch Studium ihrer Wirkung auf Thymolgelatine untersucht. Diese Methode ist vorher von *Palitsch* und *Walbum* (diese Zeitschrift **47**, 1, 1912) sowie von *Dernby* (loco cit.) angewendet worden.

175 g Gelatine werden in 350 g warmem Wasser gelöst, hierauf 0,5 g Thymol zugesetzt. Die Lösung wird dann mit warmem Wasser bis auf ein Gewicht von 550 g verdünnt und im Eisschrank aufbewahrt. Diese Stammlösung enthält 41 mg Stickstoff pro Gramm. Bei den unten folgenden Versuchen wurde eine Verdünnung von 20 g Stammlösung mit 100 g lauem Wasser angewendet.

In jeder von einer Anzahl (siehe Tabelle VII) Proberöhren wurden 4 ccm verdünnte Gelatine mit destilliertem Wasser und Salzsäure resp. Natriumhydrat so gemischt, daß die in der Tabelle angegebenen Wasserstoffionenkonzentrationen und ein Totalvolumen von 8 ccm resultierten, worauf 2 ccm Enzymlösung zugesetzt

wurde. Die Röhren wurden im Wasserbad unmittelbar auf 37° erwärmt, gut umgeschüttelt und in den Thermostaten gesetzt (37—38°). Die Enzymlösung wurde auf folgende Weise bereitet: 100 g fein gemahlenes Grünmalz (dasselbe Malz wie bei den obigen Autolyseversuchen) wurden ein paar Stunden unter oft wiederholtem Schütteln mit 400 g destilliertem Wasser bei Zimmertemperatur extrahiert. Das durch Filtrieren erhaltene klare Filtrat wurde direkt zu den Versuchen angewendet.

Nach einer gewissen Zeit (siehe Tabelle) wurden dieProberöhren aus dem Thermostaten genommen, nach vorherigem Umschütteln 15 Minuten lang in Eiswasser gestellt und dann die Konsistenz bestimmt. Dieser ist in Übereinstimmung mit *Dernby* folgende Ziffergradation gegeben worden:

0 = vollständig fest,
1 = fest, aber die Masse wird bei einigermaßen starkem Schütteln locker,
2 = fest, aber die Oberfläche bewegt sich beim Schütteln;
3 = weich,
4 = halbflüssig,
5 = fast flüssig,
6 = dünnflüssig.

Salzsäure bei 37° wirkt nicht auf das Erstarrungsvermögen der Gelatine, was Natriumhydrat dagegen tut, und im Falle dieses angewendet wurde, mußten die Proben vor der Analyse neutralisiert werden. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde elektrometrisch bestimmt. Sie änderte sich während der Reaktion nur unbedeutend.

Tabelle VII.

4 ccm Gelatine + a ccm 0,2n-HCl + b ccm 0,2n-NaOH + 2 ccm Enzymlösung + H_2O = 10 ccm.

1 ccm Gelatine enthält 7 mg Stickstoff.

Stickstoffgehalt des Grünmalzmehles = 17,2 mg pro Gramm.
Wassergehalt „ „ = 6,8%.
Temperatur = 37°.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
a =	2,0	1,5	1,3	1,1	1,0	0,9	0,8	0,5	0,3	0	0	0	0	0
b =	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0,4	0,6	0,8
p_H =	2,0	2,4	2,8	3,0	3,2	3,4	3,7	4,2	4,8	5,8	6,8	7,4	8,2	9,2
Verdauungszeit	Verflüssigungsgrad der Gelatine													
120 Std.	2	2,5	3,5	4	4,5	4	3,5	2,5	2	2	2	2	2	2
180 „	—	—	—	—	—	—	4	3	2,5	2	2	2	2	2
210 „	—	3,5	5	5,5	6	5,5	4,5	3,5	3	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Blindprobe	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Die in Tabelle VII angegebenen Werte sind in Abb. 7 graphisch dargestellt. Als Abszissen sind die Logarithmen der Wasserstoffionenkonzentration, p_H, und als Ordinaten die erhaltenen Zifferausdrücke für den Verflüssigungsgrad der Gelatine nach einer bestimmten Versuchszeit gewählt worden. Aus der Figur geht hervor, daß das Vermögen der Enzymlösung, Gelatine zu spalten, bei p_H 3,1—3,4 am größten ist.

Ähnliche Versuche wurden auch mit Grünmalzmehl anstatt Enzymlösung ausgeführt. Hierbei ersetzten 1 g Grünmalzmehl und 2 ccm

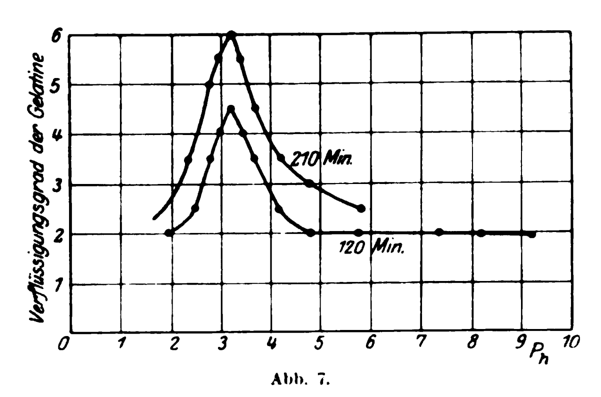


Abb. 7.

Wasser die im vorigen Versuch verwendete Enzymlösung von 2 ccm. Die Resultate, die mit dem vorhergehenden Versuch vollständig übereinstimmen, finden sich in Tabelle VII und Abb. 8. (Verflüssigungsgrad der Gelatine.)

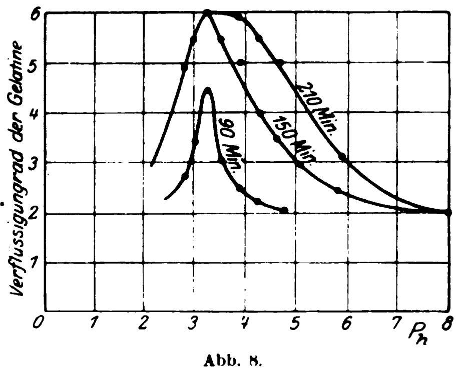


Abb. 8.

Aus den bei diesen beiden Versuchen gewonnenen Resultaten ziehen wir den Schluß, daß sich im Grünmalz ein peptisches Sekretionsenzym vorfindet, das in bezug auf Wasserstoffionen bei einer Konzentration derselben von $10^{-3,3}$ Grammionen per Liter optimal wirkt.

Tabelle VIII.

4 ccm Gelatine + a ccm 0,2 n-Salzsäure + b ccm 0,2 n-Natriumhydrat + Wasser = 10 ccm + 1 g Grünmalzmehl.

1 ccm Gelatine enthält 7 mg Stickstoff.

Stickstoffgehalt des Grünmalzmehls = 17,2 mg pro Gramm.

Wassergehalt „ „ = 6,8%.

Temperatur = 37°.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
a =	2,0	1,8	1,5	1,3	1,0	0,8	0,5	0,3	0	0	0	0	0
b =	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0,4	0,6	0,8
p_H =	2,8	3,0	3,2	3,5	3,9	4,3	4,7	—	5,8	—	—	—	8,0
Verdauungszeit	Verflüssigungsgrad der Gelatine												
90 Min.	2,5-3	3,5	4,5	3	2,5—3	2,5	2	2	2	2	2	2	2
150 „	5	5,5	6	5,5	5	4	3,5	3	2,5	2,5	—	—	—
180 „	—	6	6	6	5,5	4,5	4	3,5	3,5	2,5	2,5	—	—
210 „	6	6	6	6	6	5,5	5	4	3	2,5	2	2	2
Blindprobe	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Ähnliche Versuche wurden auch mit fertigem Pilsner Malz ausgeführt, das bei niedrigem Wassergehalt auf der Darre bis auf 100° erhitzt worden war.

In Becherkolben wurden 30 ccm der, wie oben angegeben, verdünnten Gelatinelösung mit verschiedenen Mengen 0,2 n-Salzsäure, resp. Natriumhydrat (siehe Tabelle IX), 0,2 n-Kochsalzlösung und destilliertem Wasser bis auf ein Totalvolumen von 60 ccm gemischt und dann 6 g feingemahlenes Malzmehl (von Schonischer Gerste) zugesetzt. Die Kolben wurden auf 37° erwärmt und in den Thermostaten gestellt. Nach Ablauf der in der Tabelle angegebenen Zeiten wurden nach vorhergehendem Umschütteln von jedem Kolben mit einer Pipette 5 ccm Lösung abgezogen und in dünnwandige Proberöhren überführt. Nach Abkühlung derselben mit Eiswasser durch 15 Minuten wurde die Konsistenz bestimmt.

Nach dem, was aus Tabelle IX und Abb. 9 erhellt, liegt die optimale Wasserstoffionenkonzentration hier bei einem p_H 3,7—4,4, d. h. nicht so sauer wie bei Grünmalz, und sie ist außerdem über ein größeres Gebiet ausgebreitet. Die im späteren Teil der Darrperiode herrschende hohe Temperatur scheint also die Eigenschaften der Peptase etwas zu verändern.

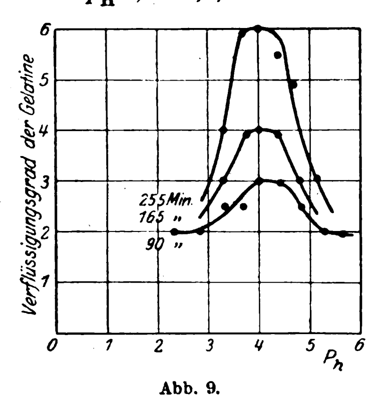


Abb. 9.

Bei Vergleich mit Tabelle VIII ersieht man, daß das Gelatinespaltungsvermögen der Peptase bedeutend größer im Grünmalz als im Malz ist. Im ersten Falle nämlich sind nicht mehr als 150 Min. für den Verflüssigungsgrad 6 erforderlich, im zweiten dagegen wenigstens 255. Die hohe Darrtemperatur wirkt also zerstörend auf die Peptase und verschiebt ihr Optimum etwas auf die alkalische Seite.

Tabelle IX.

30 ccm Gelatine + a ccm 0,2 n-HCl + b ccm 0,2 n-NaOH + c ccm 0,2 n-NaCl-Lösung + H_2O = 60 ccm + 6 g Malzmehl.

1 ccm Gelatine enthält 7 mg Stickstoff.

Stickstoffgehalt des Malzmehls = 16,0 mg pro Gramm Malz.

Wassergehalt „ „ = 8,3%.

Temperatur = 37°.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
a =	12	10	8	6	4	2	0	0	0	0	0
b =	0	0	0	0	0	0	0	2	4	6	8
c =	0	2	4	6	8	10	12	12	12	12	12
p_H =	2,4	2,8	3,3	3,7	4,0	4,4	4,8	5,2	5,6	5,9	6,2
Verdauungszeit in Minuten	Verflüssigungsgrad der Gelatine										
90 Min.	2	2	2,5	2,5	3	3	2,5	2	2	1,5	1,5
165 „	2	2	3	4	4	4	3	2	2	2	2
225 „	2	2	4	5,5	5,5	5	4	2,5	2	2	2
255 „	2	2	4	6	6	5	4,5	3	2,5	2	2
285 „	2	2	4	6	6	5,5	5	3	2,5	2	2

Bei seinen Untersuchungen über den Einfluß der Wasserstoffionen auf die Wirksamkeit des Pepsins im Magensaft hat *Sörensen* die Spaltung des Eialbumins bei verschiedenen p_H-Werten durch das in Frage stehende Enzym studiert. Beim Versuche, diese Untersuchungsmethode auf Malzpeptase anzuwenden, zeigte es sich, daß dieses Enzym Eialbumin oder daraus nach *Dernby* (loco cit.) dargestelltes Acidalbumin überhaupt nicht angriff.

Die Einwirkung der Neutralsalze auf Malzpeptase.

Bei dieser Untersuchung wurde der Einfachheit halber nur die Gelatinemethode angewendet. Die Versuche wurden bei der für Grünmalzpeptase optimalen Wasserstoffionenkonzentration von p_H 3,2—3,4 ausgeführt.

In Becherkolben wurden 25 ccm Gelatine (verdünnte Stammlösung) mit 9,00 ccm 0,2 n-Salzsäure, 8 ccm 3 n-Salzlösungen nach Tabelle X und 18 ccm destilliertem Wasser gemischt. 6 g Grünmalzmehl wurden zugesetzt, dann die Kolben auf 37° erwärmt und in den Thermostaten gesetzt. Nach Ablauf der in der Tabelle angegebenen Zeiten wurde die Konsistenz auf dieselbe Weise wie oben beim Versuch mit Malz bestimmt. Die zugesetzten Neutralsalze hatten in der Versuchsflüssigkeit eine Konzentration von 0,4 Grammäquivalenten per Liter. Nach *Dernby* (l. c.) erhält man nämlich bei Anwendung von größeren als n-Salzkonzentrationen unsichere Resultate auf Grund teilweise eintretender Aussalzung der Gelatine, die die Flüssigkeit nur mit Schwierigkeit fest werden läßt. Bei niedrigeren Salzkonzentrationen übt das zugesetzte Salz keinerlei Wirkung auf die Erstarrungsfähigkeit der Gelatine aus.

Tabelle X.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Zugefügtes Salz	Ohne Salzzusatz	NaCl	KCl	KBr	KJ	KNO_3	Na_2SO_4	$CaCl_2$	$MgCl_2$
p_H	3,35	3,35	3,35	3,35	3,3	3,2	3,2	3,4	3,4
Verdauungszeit	Verflüssigungsgrad der Gelatine								
60 Minuten	3,5	3,5	3,5	4	4	3,5	5	3,5	3,5
90 "	3,5	4	4	4	4	4,5	5	3,5	3,5
120 "	4	4	4	4.5	4.5	4,5	5,5	3,5	4
180 "	5	5	4,5	5	4,5	5	6	4	4
210 "	6	6	5,5	6	5	6	6	4,5	4,5

Nur in den beiden letzten Fällen, wo $CaCl_2$ und $MgCl_2$ zugesetzt wurden, konnte eine beachtenswerte Hemmung der Enzymwirksamkeit beobachtet werden. *Dernby* hat betreffs $MgCl_2$ dasselbe Phänomen bei seinen Untersuchungen mit Hefepepsin und Hefeereptase beobachtet. Bei Anwendung von KNO_3 und Na_2SO_4 scheint eine Aktivierung der Enzymwirksamkeit vorzuliegen, die aber vermutlich dadurch zu erklären ist, daß die Wasserstoffionenkonzentration hier etwas mehr optimal liegt.

Als allgemeines Urteil kann gesagt werden, daß Neutralsalze, die die Wasserstoffionenkonzentration nicht verändern, bei der hier angewendeten Konzentration nur eine unbedeutende Wirkung auf die Gelatinespaltungsfähigkeit der Malzpeptase ausüben. Dagegen sind Wasserstoff- oder Hydroxylionenkonzentrationen von fundamentaler Bedeutung für die Enzymwirksamkeit.

Die Malzpeptase hydrolysiert demnach die eigenen Eiweißstoffe des Malzes (aber nicht Eialbumin und daraus dargestelltes Acidalbumin) und Thymolgelatine in Albumosen und Peptone. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration für diese Reaktion liegt beim Grünmalz bei p_H 3,2—3,4 und beim Malz bei p_H 3,7—4,3. Hierin unterscheidet sich dieses Enzym vom Pepsin des Magensaftes (*Sörensen*) und von Hefepepsin (*Dernby*), wo die entsprechenden Ziffern 1,5, resp. 4—4,5 betragen.

Die Neutralsalze haben nur einen sehr unbedeutenden Einfluß auf die Enzymwirksamkeit. Malzpeptase kommt als Sekretionsenzym vor. Ob sich auch peptische Endoenzyme vorfinden, ist nicht festgestellt worden. Die effektive Enzymkonzentration ist bei Grünmalz bedeutend größer als bei Malz.

III. Malztryptase.

Um die Säuerungsbedingungen der tryptischen Enzyme des Malzes zu bestimmen, wurde unten ihre Hydrolyse des Witte-Peptons bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen untersucht. Die Methode ist dieselbe, die *Michaelis* und *Davidsohn* (diese Zeitschrift **36**. 1911) bei ihren Untersuchungen des Pankreastrypsins und *Dernby* (loco cit.) bei Hefetryptase anwendeten.

Die Peptonlösung wurde in Übereinstimmung mit *Dernby* auf folgende Weise bereitet: 40 g Witte-Pepton wurden in der Schüttelmaschine 2 Stunden lang mit 1 Liter Wasser geschüttelt, die Lösung mit Tierkohle im Wasserbad erhitzt, ein paar Minuten gekocht und filtriert (bei Bedarf durch Kieselgur). Das vollständig klare Filtrat wurde mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und im Eiskasten verwahrt.

In Becherkolben von 200 ccm wurden 50 ccm Peptonlösung, Salzsäure resp. Natriumhydrat (so, daß die gewünschte Wasserstoffionenkonzentration erreicht wurde), 50 ccm Phosphatlösungen, Kochsalzlösung (so, daß überall dieselbe Chlorionenkonzentration resultierte) mit destilliertem Wasser bis auf 170 ccm gemischt. Jedem Kolben wurden hierauf 6 g Grünmalzmehl zugesetzt. Als Antisepticum diente 0,2 ccm Chloroform. Die Versuchstemperatur war 37°. Nach Ablauf der in der Tabelle angegebenen Zeiten wurden nach vorhergehendem Umschütteln 20 ccm Lösung auf Meßkolben von 50 ccm abpipettiert und 15 Minuten lang ins kochende Wasserbad gestellt, so daß die Enzyme vernichtet wurden. Nach Ausfällung der Phosphate wurden die Lösungen wie oben formoltitriert.

Tabelle XI zeigt die Anzahl Milligramm des beim Versuch gebildeten Formolstickstoffs. Die präexistierende Menge Formolstickstoff in der Peptonlösung und im Malzmehl ist mithin in diesen Werten nicht mitberechnet.

In Abb. 10 stellen drei Kurven, 1, 2 und 3, entsprechend einer Versuchszeit von 15, 48, 65 Stunden die Variation des Formolstickstoffs mit der Wasserstoffionenkonzentration dar. Die Tabellenwerte enthalten eine beachtenswerte Menge Formolstickstoff.

Tabelle XI.

a ccm 0,2 n-HCl + b ccm 0,2 n-NaOH + c ccm 0,2 n-NaCl + d ccm 0,2 m-KH_2PO_4 + e ccm 0,2 m-Na_2HPO_4 + 50 ccm Peptonlösung + Wasser = 170 ccm + 6 g Grünmalzmehl.

Stickstoffgehalt des Grünmalzes = 17,2 mg pro Gramm Malz.
Wassergehalt „ „ = 6,8%.
Gehalt des Grünmaltes an präexistierendem Formolstickstoff = 7,4%.
Temperatur = 37°.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a =	15.0	11,0	8,0	5,8	5,0	2.4	0.3	—	—	—	—	—
b =	—	—	—	—	—	—	—	—	1,5	3.2	5.0	6.0
c =	0	4.0	7.0	9.2	10.0	12,6	14.7	15,0	15.0	15.0	15.0	15.0
d =	50,0	50.0	48.7	47.7	47.2	43.7	40,0	33.0	26,2	16.0	8,0	6.0
e =	0	0	1.3	2.3	2.8	6.3	10.0	17.0	23.8	34.0	42.0	44.0
p_H =	3.5	4.0	4.6	5.0	5.2	5,8	6,0	6.3	6,6	7,0	7.3	7,5
Autolysezeit						mg Formolstickstoff						
0 Stunden	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 „	—	—	32.6	—	—	34.6	33.7	33.7	33,0	29.2	—	23.2
15 „	—	35.5	39.6	40.1	39.7	40.8	39.9	39.7	—	34.1	30,8	—
24 „	48.2	51.6	55.9	55.9	55.9	55.9	55,9	54.2	52.5	49.0	—	—
48 „	74.5	78.9	86.5	86.5	86.3	86.5	86.3	86.2	—	79,1	—	—
65 „	81,7	86,9	93.4	93,9	93.9	94.9	94,9	93.9	—	87,7	83,4	—

der sich aus dem Grünmalz gebildet hat; daher muß man, um die Reaktion der Malztryptase mit der Peptonlösung überblicken zu können, diesen Stickstoff quantitativ genau kennen und die Tabellenwerte dementsprechend herabsetzen. Beim Autolyseversuch in Tabelle I wurde dasselbe Grünmalz wie bei diesem Versuche angewendet, weshalb man die gewünschten Formolwerte, entsprechend einer Autolysezeit von 15, 48 und 65 Stunden, aus Tabelle I und Abb. 2 erhalten kann. Der präexistierende Formolstickstoff, der 7,4% des totalen Stickstoffgehaltes im Grünmalz erreicht, wird abgezogen und wir finden auf diese Weise, daß bei obigem Versuch folgende Anzahl mg Formolstickstoff vom verwendeten Grünmalz herrühren:

Verdauungszeit	p_H = 3,6	4,1	4,8	5,5	6,1	6,5	6,8	7,5
0 Stunden	0	0	0	0	0	0	0	0
15 „	7.1	8,0	8.1	7,1	6.1	5,5	4,4	4.0
48 „	19.2	20.5	20,5	18,1	16,8	15,1	13,4	12,4
65 „	24,0	26,1	26,1	23,3	21,3	20,0	17,0	15,8

Tabelle XII.

Vom Peptidstickstoff der Peptonlösung sind folgende Anzahl Prozent Formolstickstoff gebildet worden:

Verdauungszeit	p_H = 3,5	4,5	5,5	6,3	7,0	7,5
	% Formolstickstoff					
0 Stunden	0	0	0	0	0	0
15 "	10	14	16	16	14	12
48 "	27	30	32	34	31	29
65 "	28	31	33	35	33	31

Die Kurven 4, 5 und 6 in Abb. 10 repräsentieren diese Tabelle. Ziehen wir diese Kurve von den Kurven 1, 2 und 3 ab, so erhalten wir die Kurven 7, 8 und 9, die mithin die Reaktion der Malztryptase mit dem Pepton indizieren. Das Optimum liegt um p_H 6,3. Die den Kurven entsprechenden Ordinaten geben die Anzahl mg Formolstickstoff an, der bei verschiedenen Zeiten und p_H-Werten sich aus dem Pepton bildete. In Tabelle XII sind diese Formolwerte für die Wasserstoffionenkonzentrationen p_H 3,5, 4,5, 5,5, 6,3, 7,0 und 7,5 in Prozente des ursprünglichen Peptidstickstoffgehaltes des Peptons umgerechnet worden.

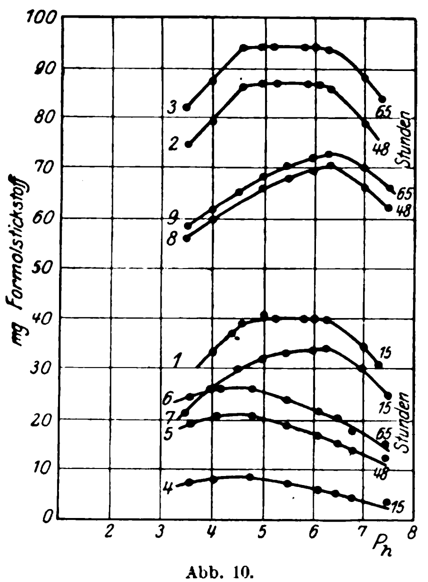


Abb. 10.

In Abb. 11 wurde die in Stunden ausgedrückte Versuchszeit als Abszissen und die Prozente gebildeten Formolstickstoffs (aus Tabelle XII) als Ordinaten gewählt.

Aus dieser Abbildung wurden die Zeiten gewonnen, die erforderlich sind, um 15, 20 und 25% der anwesenden Peptidverbindungen zu spalten. Genannte Zeiten wurden in Abb. 12 als Ordinaten gesetzt; die entsprechenden p_H-Werte sind Abszissen.

Das Minimum der Kurven liegt bei p_H 6,3, welcher Wert demnach den negativen Logarithmus für die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Malztryptase angibt.

Aus Abb. 11 ersehen wir, wie die Peptonspaltung mit anfangs großer, jedoch bald abnehmender Geschwindigkeit vor sich geht; nach

Spaltung von etwa 35% des Substrates scheint die Reaktion aufzuhören. Zusatz von weiterem Enzymsubstrat hat nur eine unbedeutende Wirkung.

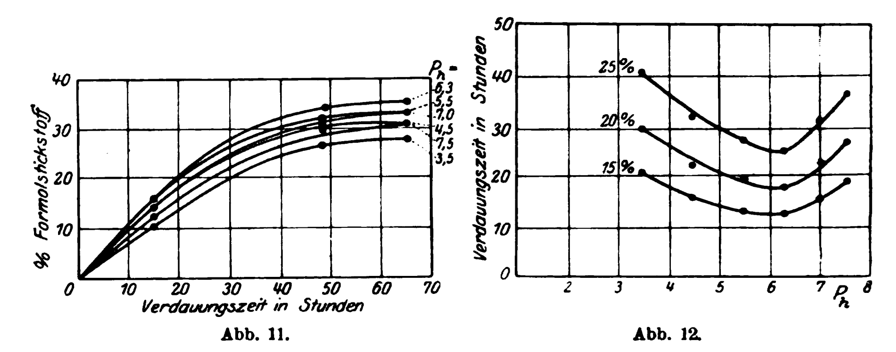


Abb. 11. Abb. 12.

Ebenso wie die Malzpeptase greift die Malztryptase weder Eialbumin noch daraus dargestelltes Acidalbumin an.

Nach *Schjernings* Untersuchungen üben die die Wasserstoffionenkonzentration nicht verändernden Neutralsalze nur einen sehr unbedeutenden Einfluß auf den Mälzungs- und Maischprozeß aus, welche ja das Resultat der gemeinsamen Wirkung sämtlicher Enzyme sind. Auf S. 211 wurde das Entsprechende von der Malzpeptase konstatiert. Wir haben demnach die größte Veranlassung zu vermuten, daß sowohl die Malztryptase als auch der Autolyseprozeß von obengenannten Salzen nur wenig beeinflußt werden.

Wir können die Malztryptase folgendermaßen charakterisieren: Das Enzym greift weder die eigenen Eiweißstoffe des Malzes noch Acidalbumin noch Thymolgelatine, wohl aber Witte-Pepton an, welch letzteres aber auch nicht vollständig zu Aminosäuren abgebaut werden kann. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration liegt bei p_H 6,2—6,4 bei 37°. Der entsprechende Wert für Pankreastrypsin ist p_H 8 und für Hefetryptase p_H 6,9—7,1. Ob das oben beschriebene Enzym zu den tryptischen oder zu den ereptischen zu rechnen ist, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden.

IV. Malzkeimtryptase.

Bei Untersuchung dieses Enzyms konnte sowohl die Gelatine- wie die Peptonmethode angewendet werden.

Die erstgenannte wurde in vollständiger Übereinstimmung mit den Angaben für Malzpeptase auf S. 206 und in Tabelle VII ausgeführt.

Tabelle XIII.

4 ccm Gelatine + a ccm 0,2 n-HCl + b ccm 0,2 n-NaOH + H_2O = 10 ccm + 0,75 g Malzkeimmehl.

1 ccm Gelatine enthält 7 mg Stickstoff.

Stickstoffgehalt des Malzkeimmehles = 37,7 mg pro Gramm Malz.

Wassergehalt „ „ = 9,8%.

Temperatur = 37°.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a =	3,5	1,5	0,5	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0
b =	0	0	0	0	0	0,3	0,5	0,8	1,0	1,3	1,5	2,0
p_H =	2,6	4,1	5,0	5,4	5,8	6,3	6,5	6,9	7,3	7,5	7,8	8,3
Verdauungszeit	**Verflüssigungsgrad der Gelatine**											
100 Minuten	2	2	2	2	3	4	4	4	4	3,5	—	—
150 „	2	2	2	2,5	3	5	6	6	5,5	—	3,5	3
180 „	2,5	3	3,5	—	4	6	6	6	6	—	—	—

In Tabelle XIII und in Abb. 13 sind die Versuchsresultate verzeichnet. Daraus ersehen wir, daß die Gelatinespaltung bei einer Wasserstoffionenkonzentration von p_H 6,3—7,3 am besten verläuft. Die saure Grenze, p_H 6,3, fällt mit dem Optimum der Malztryptase zusammen. Analog wie bei der Gelatinespaltung des Malzes (s. S. 209) konstatieren wir auch hier bei dem reagierenden Enzym eine optimale Wirksamkeitszone und nicht einen bloßen optimalen Wirksamkeitspunkt.

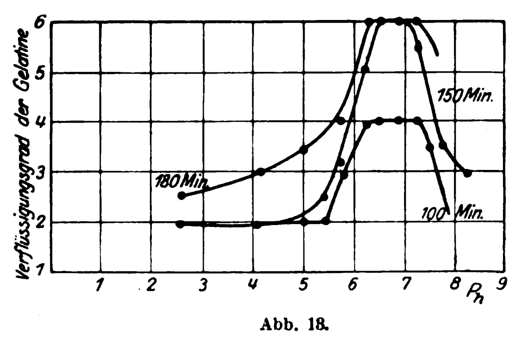


Abb. 13.

———

Die Peptonmethode wurde nach der Beschreibung auf S. 211 ausgeführt. Tabelle XIV und Abb. 14 zeigen das Resultat als mg *neugebildeten* Formolstickstoff. In der Abbildung sind die p_H-Werte die Abszissen und der gebildete Formolstickstoff (in mg) die Ordinaten. Die in den Tabellenwerten enthaltenen Formolstickstoffmengen, die von der Eiweißautolyse der Malzkeime herrühren, werden entsprechend den Angaben auf S. 202 mit Hilfe von Abb. 5, S. 201, für die Wasserstoffionenkonzentrationen p_H 6,0, 6,3 und 6,6 und die Zeiten von 15,41 und 65 Stunden eliminiert. Aus den Eiweißstoffen der Malzkeime bildeten sich bei den obengenannten Wasserstoffionenkonzentrationen und Zeiten folgende Anzahl mg Formolstickstoff:

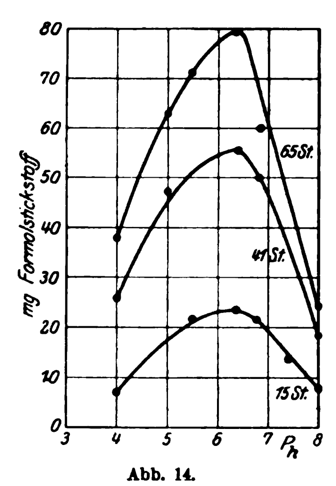


Abb. 14.

Verdauungszeit	p_H =		
	6,0	6,3	6,6
0 Stunden	0	0	0
15 "	9	9	9
41 "	17	17	17
65 "	20	20	20

In Abb. 14 lese man die Formolwerte für p_H 6,0, 6,3 und 6,6 ab und subtrahiere davon die entsprechenden Werte derobigen Tabelle. Dadurch erhält man den Formolstickstoff, der bei diesen Wasserstoffionenkonzentrationen aus dem Pepton stammt. In Prozente des ursprünglichen Gehaltes des Peptons an nicht formoltitrierbaren Stickstoffverbindungen umgerechnet, findet er sich unten in Tabelle XV und in Abb. 15.

Tabelle XIV.

a ccm 0,2 n-HCl + b ccm 0,2 n-NaOH + c ccm 0,2 n-NaCl + d ccm 0,2 m-KH_2PO_4 + e ccm 0,2 m-Na_2HPO_4 + 50 ccm Peptonlösung + Wasser = 170 ccm + 2 g Malzkeimmehl.

Dieselben Malzkeime wie in Tabelle III, S. 201, wurden verwendet.

Temperatur = 37°.

	1	2	3	4	5	6	7
a =	5,0	0,5	0	0	0	0	0
b =	0	0	1,0	3,0	4,5	6,5	9,0
c =	0	4,5	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
d =	50,0	47,7	45,0	31,0	21,2	6,4	1,3
e =	0	2,3	5,0	19,0	28,8	43,6	48,7
p_H =	4,0	5,0	5,5	6,4	6,8	7,4	8,0
Verdauungszeit	mg neugebildeter Formolstickstoff						
0 Stunden	0	0	0	0	0	0	0
15 "	6,5	—	21,9	23,6	21,9	13,3	8,2
20 "	—	—	—	33,8	28,7	—	—
41 "	25,3	47,5	49,2	56,1	49,2	—	18,4
65 "	37,3	62,9	71,5	80,0	59,5	37,3	23,6

Tabelle XV.

Aus dem ursprünglichen Gehalt der Peptonlösung an Peptidstickstoff bildete sich folgende Anzahl Prozent Formolstickstoff:

Verdauungszeit	p_H =		
	6,0	6,3	6,6
0 Stunden	0	0	0
15 "	7	7	7
41 "	18	18	17
65 "	27	29	25

Wir konstatieren ein scharfes Optimum bei p_H 6,3. Dieser Wert stellt auch die saure Grenze für die optimale Gelatinespaltung dar. Bei Vergleich von Abb. 11 und Abb. 15 sehen wir, daß sowohl bei Malz- als auch bei Malzkeimtryptase die Peptonspaltung bis zur Bildung von 25—30% Formolstickstoff so ziemlich direkt proportional der Zeit verläuft.

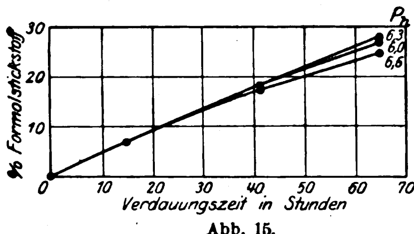


Abb. 15.

Ebensowenig wie Malzpeptase oder Tryptase greift dieses Enzym Ei- oder Acidalbumin an.

Die Einwirkung der Neutralsalze auf die Malzkeimtryptase.

Bei dieser Untersuchung fand wie bei der Malzpeptase nur die Gelatinemethode Anwendung. Wie oben gezeigt, liegt das Optimum der Malzkeimtryptase bei einem Wert von p_H 6,2—6,4 und es wurden daher die unten folgenden Untersuchungen möglichst nahe an dieser Wasserstoffionenkonzentration ausgeführt.

In Becherkolben wurden 25 ccm Gelatine (verdünnte Stammlösung mit 4,7 ccm 0,2 n-NaOH, 8 ccm 3-normalen Salzlösungen und 32 ccm destilliertem Wasser gemischt, dann 4,7 g Malzkeimmehl zugesetzt. Die Analyse wurde ebenso wie beim entsprechenden Malzversuch ausgeführt (die Proben standen jedoch diesmal 30 Minuten in Eiswasser, ehe die Konsistenz bestimmt wurde). Die zugesetzten Neutralsalze hatten in der Versuchsflüssigkeit eine Konzentration von 0,3—0,4 normal.

Tabelle XVI.

Einwirkung der Neutralsalze auf Malzkeimtryptase. Temperatur 37°.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Beigegebenes Salz	Ohne Salzzusatz	NaCl	KCl	KBr	KNO_3	Na_2SO_4	$CaCl_2$	$MgCl_2$
Verdauungszeit	Verflüssigungsgrad der Gelatine							
60 Min.	3,5	3,5	3,5	4	4	3	3	3,5
80 „	4	4	4	5	4,5	3,5	3	3
100 „	4	4,5	4,5	5,5	5	4	3,5	3.5

In den Fällen 4 und 5 (KBr und KNO_3) scheint eine Aktivierung vorzuliegen, die aber dadurch erklärt werden kann, daß in diesen beiden Fällen die Wasserstoffionenkonzentration mehr optimal liegt als in den übrigen. In 7, bei Zusatz von $CaCl_2$, war p_H 6,0, weshalb man daher nicht berechtigt ist, daraus irgendwelche Schlüsse auf die hemmende

Wirkung dieses Salzes zu ziehen. Nur bei Zusatz von $MgCl_2$ kann man eine hemmende Einwirkung auf die Tryptase verspüren (was mit dem bei Malzpeptase gewonnenen Resultate übereinstimmt).

Die Neutralsalze üben also bei den in diesen Versuchen angewendeten Konzentrationen nur einen sehr unbedeutenden Einfluß auf die peptischen und tryptischen Enzyme in Malz und in Malzkeimen aus, und man dürfte daraus schließen können, daß die Eiweißautolyse in diesen beiden Substanzen ziemlich unbeeinflußt von ähnlichen Salzen verläuft, was weiter auch durch *Schjernings* korrespondierende Untersuchungen über den Maischprozeß bestärkt wird.

Malzkeimtryptase greift die eigenen Eiweißstoffe des Malzes (aber nicht Acidalbumin), Thymolgelatine und Witte-Pepton an. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration ist p_H 6,2—6,4 (Gelatinespaltung p_H 6,3—7,3).

Zusammenfassung.

Vergleichung peptischer und tryptischer Enzyme im tierischen Organismus, in Hefe und in Malz.

Tier-Organismus	Hefe	Malz
Pepsin Opt. p_H = 1,5	Hefepepsin Opt. p_H = 4—4,5	Malzpeptase Malz: Opt. p_H = 3,7—4,3 Grünmalz: Opt. p_H = ca. 3,2 Malzkeimpeptase fehlt
Pankreastrypsin Opt. p_H = 8,0	Hefetryptase Opt. p_H = ca. 7,0	Malztryptase Grünmalz: Opt. p_H = ca. 6,3 Malzkeimtryptase Opt. p_H = ca. 6,3

Bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration üben Neutralsalze (in geringerer Konzentration als 1-normaler) entweder gar keine oder doch nur eine sehr geringe Wirkung auf diese Enzyme aus.

Die Eiweißautolyse im Malz und in den Malzkeimen wird von den darin vorkommenden proteolytischen Enzymen hervorgebracht und ist eine sukzessive Eiweißspaltung, die nur bei solchen Wasserstoffionenkonzentrationen eintreten kann, die die gleichzeitige Wirksamkeit der in Betracht kommenden Enzyme zulassen. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration beträgt bei Malz p_H 4,3—5,0, bei Grünmalz ca. 4,4 und bei Malzkeimen ca. 6,3.

Über das vermutliche Vorkommen von proteinogenen Aminen in der Schilddrüse.

Von

Ubaldo Sammartino (Rom).

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 15. April 1922.)

Die seit langer Zeit geführten Untersuchungen über die wirksame Substanz, sowie über das innere Sekret (Inkret) der Thyreoidea gipfelten seinerzeit in der Entdeckung eines jodhaltigen Eiweißkörpers in der Schilddrüse durch *E. Baumann*, aus welchem dieser durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure einen Niederschlag erhalten konnte, der in Alkohol löslich, durch Säure wieder fällbar war und einen Jodgehalt von etwa 10% hatte. Diese, Jodothyrin genannte, unlösliche Substanz war anscheinend ein Kunstprodukt und die Vermutung, daß diese Substanz oder ihre Muttersubstanz zugleich das innere Sekret darstellen, wurde vielfach von den Forschern abgelehnt, um so mehr, als man auch ungemein jodarme und jodfreie Drüsen beobachten konnte, bei sonst normalen Tieren. Die Aufklärung über die jodhaltige Substanz selbst brachten uns die ausgezeichneten Untersuchungen von *Kendal*[1]), welcher in der Reindarstellung und in der Krystallisation des Thyrotoxins gipfelten, welches sich als Derivat des Tryptophans und zwar als ein jodhaltiges Derivat herausstellte.

Es war aber schwer anzunehmen, daß dieser Gewebsbestandteil, das Thyrotoxin oder seine Muttersubstanz, das jodhaltige Thyreoglobulin zugleich das Inkret der Drüse darstellen und besonders die Untersuchungen von *Asher* und seinen Schülern wiesen darauf hin, daß die Wirkungen der ganzen Thyreoidea und des Jodothyrins, bzw. des jodfreien Schilddrüsenextraktes nicht identisch sind.

Das Extrakt der Schilddrüse erhöht die Sensibilierung des Adrenalins. Die Wirkung des Schilddrüsengewebes auf den Sympathicus kann man am besten am Splanchnicus studieren, da die Erregbarkeit des Splanchnicus erhöht wird. Dieselbe Wirkung, welche die Schilddrüse auf den Splanchnicus ausübt, kann man auch erzielen, wenn man die

---

[1]) Journal of biolog. chemistry **39**, 15. 1919; **40**, 265. 1919.

Nerven der Schilddrüse reizt. Die innere Sekretion der Schilddrüse steht daher unter dem Einfluß der Nerven. *Asher* hält für die wichtigste physiologische Funktion des Inkretes der Thyreoidea die Vergrößerung der Anspruchsfähigkeit des sympathischen und parasympathischen Systems.

Die gleiche Wirkung auf das sympathische und parasympathische System, wie es Schilddrüsentabletten haben, erzielte *Asher* auch mit dem eiweiß- und jodfreien Thyreoglandol, dessen Wirkung ungefähr dieselbe ist, wie die der ganzen Thyreoidea.

Aus den Untersuchungen von *B. Romais*[1]) kann man schließen, daß die Substanz, deren Verfütterung bei Kaulquappen Entwicklungsbeschleunigung, Wachstumstillstand und in extremen Fällen Kachexie und Tod zur Folge haben, der getrockneten Drüsensubstanz durch Toluol, Äther und Aceton überhaupt nicht, durch hochprozentigen Alkohol nur in Spuren entzogen wird, da auch tagelang extrahierte Thyreoidea ihre äußerst starke spezifische Wirkung nicht einbüßt.

Jodothyrin wirkt aber auf Kaulquappen in der Weise ein, daß sie eine überstürzte Entwicklung eingehen, die mit einem sehr starken Abbau der Körpersubstanz gepaart ist. Es ist aber ein Unterschied zwischen den Jodothyrinlarven und den Larven, welche mit entfetteter Schilddrüsentrockensubstanz gefüttert wurden.

Jodothyrintiere sterben meist am gleichen Tage, während die Thyreoideatiere noch längere Zeit am Leben bleiben. Auch sonst sind somatische Differenzen zu beobachten.

Das Dialysat entfetteter Drüsentrockensubstanz wirkt nun ebenfalls verschieden ein. Hier kommt es auch anfangs zu einer Beschleunigung, dann aber zu einer Verzögerung der Entwicklung und kein einziges Tier vollendet die Metamorphose. Das Dialysat unterscheidet sich erheblich in der Wirkung von frischer oder getrockneter Drüsensubstanz. Es hat eher eine Metamorphose hemmenden Einfluß.

Eiweißfreie Ultrafiltrate aus frischer oder entfetteter Schilddrüse gewonnener wässeriger Extrakte hatten weder eine Entwicklungsbeschleunigung, noch eine Wachstumshemmung zur Folge. Auch der mit Gerbsäure enteiweißte, wässerige Extrakt frischer Thyreoidea rief keine Entwicklungsbeschleunigung hervor. Er verursachte eine geringe Wachstumshemmung, welche sich jedoch später nach Aufhören der Behandlung ausglich.

Der aus entfetteter Drüsensubstanz hergestellte Extrakt erzeugt dagegen schon nach zweimaliger Verabreichung eine sehr starke Entwicklungsbeschleunigung und Wachstumshemmung.

Die Untersuchungen von *Romais* zeigten, daß die Toluol-, besonders die Acetonextrakte der Schilddrüse entwicklungshemmend wirken, während das Wachstum durch sie nicht wesentlich beeinflußt wird.

[1]) Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **6**, 101. 1918.

Der nachher aus der Thyreoidea dargestellte Extrakt mit 96%igen Alkohol ruft dagegen eine beschränkte Entwicklungsbeschleunigung und Wachstumshemmung hervor. Sicher ist, daß die bei der Verfütterung des Acetonextraktes aus der Schilddrüse beobachteten Entwicklungshemmungen durch keine Eiweißkörper hervorgerufen werden.

Das jodfreie Nucleoproteid der Thyreoidea erzeugt eine Entwicklungsbeschleunigung mit gleichzeitiger Wachstumsförderung, während die eiweißfreien Extrakte der Schilddrüse eine Wachstumshemmung bei fehlender Entwicklungsbeschleunigung hervorrufen.

Der bei totaler Schilddrüsenfütterung eintretende Abbau der Körpersubstanz scheint aber mit dem Jodgehalt der Schilddrüse zusammenzuhängen, denn so jodarme Präparate wie das Thyreoglandol wiesen ihn nur äußerst gering auf.

Arbeiten von *O. Wienand*, *Rose*, *Fawcett*, *Rate*, *Hackett* und *Rogers* (1915) zeigten aber, daß vielleicht auch eiweißfreie Thyreoideapräparate physiologische Wirkungen haben und *E. Abderhalden*, welcher mit Dialysaten und wässerigen Extrakten der Thyreoidea arbeitete, sagt, daß jene Produkte, die die Entwicklung der Kaulquappen beeinflussen, sicherlich der Gruppe der Eiweißkörper und Peptone nicht angehören. Kommen Eiweißabkömmlinge als wirksame Stoffe in Frage, dann können es nur tiefere Abstufungen von Proteinen oder bestimmte ihrer Bausteine sein.

Die Schwierigkeit bei allen diesen Versuchen ist, daß eventuell Spuren von Eiweiß in solchen Extrakten enthalten sind, die die Wirksamkeit der eiweißfreien Verbindungen vortäuschen könnten.

So konnte *Abelin*, der mit einem Eiweiß-Lipoid- und fast jodfreiem Schilddrüsenextrakt, dem sogenannten Thyreoglandol bei normalen und thyreoidektomierten Hunden Stoffwechselversuche unternahm, behaupten, daß der eiweißfreie Auszug aus der Schilddrüse die charakteristischen Wirkungen auf den Stoffwechsel habe. Unter dem Einfluß dieser Schilddrüsensubstanz treten sowohl bei normalen, als auch bei thyreoidektomierten Hunden eine sehr wesentliche Steigerung des Hungereiweißumsatzes ein. Aber das gleiche Präparat übt nach Untersuchungen von *Romais* auf Entwicklung und Wachstum der Kaulquappen nur einen sehr geringen Einfluß aus. Wie *E. Abderhalden*[1]) auf Grund seiner Versuche über die beschleunigte Metamorphose der Kaulquappen der Frösche zum Schluß kommen konnte, daß die von der Schilddrüse abgesonderten wirksamen Produkte nicht zur Reihe der Eiweißkörper gehören, so konnte auch *E. Herzfeld* und *R. Klinger*[2]) über erfolgreiche Versuche mit eiweißfreien Schilddrüsenauszügen bei Ratten berichten, indem sie ein Verschwinden der künstlich erzeugten Schilddrüsendegeneration bei der Ratte beobachteten. *J. Abelin*[3]) konnte nachweisen, daß einige proteinogene Amine, wie Phenyläthylamin und p-Oxyphenyläthylamin, eine starke Erhöhung des Eiweißstoffwechsels bewirken und daß die 3 typischen Wir-

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **162**.

[2]) Verhandl. d. Schweiz. Naturf.-Ges. in Zürich 1917, Münch. med. Wochenschr. 1918.

[3]) Diese Zeitschr. **93**, 128.

kungen der Schilddrüsenzufuhr, welche in einer Hebung des Eiweißumsatzes, resp. in einer gesteigerten Stickstoffausscheidung durch den Harn, weiters in einer Diurese, hauptsächlich in den ersten Tagen nach Eingabe der Präparate und in einer Abnahme des Körper gewichtes bestehen, in ganz spezifischer Weise auch von den proteinogenen Aminen ausgelöst werden, woraus er noch den Schluß zieht, daß die Stoffwechselwirkung der Schilddrüse nicht auf der Wirkung des Eiweißkörpers beruht, sondern daß vielmehr die Schilddrüseneiweißkörper als die Muttersubstanz der wirksamen Stoffe anzusehen sind, in diesem Falle also die der supponierten proteinogenen Amine. Ebenso wird nach weiteren Untersuchungen[1]) der Gaswechsel von den proteinogenen Aminen erhöht, was Schilddrdrüsensubstanz ebenfalls und ebenso macht.

Die eigenartige Schilddrüsenwirkung, welche *Gudernatsch* zuerst beobachtet hat, die eigenartige Metamorphose der Kaulquappen kann durch das p-Oxyphenyläthylamin ebenfalls durchgeführt werden, viel stärker aber durch das Dijodtyramin, das dijodierte p-Oxyphenyläthylamin, während es Jodsalze nicht vermögen.

Die bisherigen Versuche, soweit sie zur Lösung der Frage beitragen, haben aber bis jetzt keine Entscheidung darüber gebracht, ob die jodhaltigen Eiweißkörper der Schilddrüse, bzw. sein jodhaltiger Tryptophanspaltling, das Thyreotoxin, identisch mit dem Inkret der Schilddrüse ist, welches wie das Adrenalin der Nebenniere kontinuierlich in den Kreislauf gebracht wird und dessen Vermehrung oder Verminderung die charakteristischen Erscheinungen der Hyperthyreoidie bzw. Hypothyreoidie auslösen.

Wir haben nun versucht, dieser Frage wieder auf rein chemischem Wege beizukommen, trotz der gewiß sehr großen Schwierigkeiten, welche gerade im gegenwärtigen Momente solchen Experimenten bei uns entgegen stehen. Da die Vermutung ausgesprochen war, daß es sich vielleicht bei diesem Inkrete um die bis nun bekannten, vier aromatischen proteinogenen Amine als da sind: Phenyläthylamin, *p*-Oxyphenyläthylamin, β-Imidazolyläthylamin und β-Indoläthylamin handeln könnte, so mußte man, da ja diese aus den entsprechenden Aminosäuren, dem Phenylalanin, dem Tyrosin, dem Histidin und dem Trytophan unter der Einwirkung von Fäulnisbakterien leicht entstehen können, vorerst eine solche Bildung ausschließen und daher war das Arbeiten mit käuflicher getrockneter Schilddrüse oder einem der bekannten Schilddrüsenpräparate völlig ausgeschlossen und wir mußten alle Experimente mit ganz frischer Schilddrüse, die dem eben geschlachteten Tiere entnommen war, ausführen, was natürlich hinderte, sehr große Quanten dieser Organe gleichzeitig zur Verarbeitung zu bringen.

Wir haben uns vorerst bestrebt überhaupt zu untersuchen, ob ein oder das andere der wirksamen aromatischen Äthylamine nachzuweisen wäre. Wir gingen in der Weise vor, daß wir das ganz frisch aus dem Schlachthaus bezogene eiskalte Organ schnell durch die Fleischmaschine trieben und in die doppelte Menge siedenden Wassers brachten, welches

[1]) *Abelin* (diese Zeitschr. **101**, 197. 1920).

mit Essigsäure angesäuert war. Wir verarbeiteten die Schilddrüse in Mengen von 3 kg. Dieses erste Dekokt wurde abgegossen und der Vorgang der Extraktion mit siedendem Wasser wiederholt. Der Rückstand wurde stark abgepreßt und alle Auszüge vereinigt und nun mit essigsaurem Blei, nachdem man sie vom Fett teils mechanisch, teils durch Ätherextraktion befreit hatte, gefällt, hierauf wurde das Filtrat von der Bleifüllung mit Schwefelwasserstoff entbleit, vom Schwefelblei filtriert, der Überschuß des Schwefelwasserstoffes mit Kohlensäure weggeblasen und im Vakuum sehr stark eingeengt. Man fällt hierauf die Leimsubstanz und Salz mit Alkohol so lange noch eine Trübung entsteht, bis die Lösung klar wird, engt die alkoholische Lösung im Vakuum wieder sehr stark ein und fällt wieder mit Alkohol. Diese alkoholische Lösung wird nun wieder sehr stark eingeengt.

Wir haben verschiedene Wege eingeschlagen, um in diesem Extrakt Substanzen zu suchen. Aus dem Alkohol krystallisierte Inosit, dessen Gegenwart in der Thyreoidea bereits durch die Untersuchungen von *Tamann* und *Sigmund Fränkel* vor vielen Jahren bekannt geworden ist. Die verschiedenen Versuche mit Phosphor-Wolframsäure und Metallsalzen zum Ziele zu kommen, wollen wir vorläufig unerörtert lassen, da sie keine positiven Resultate brachten. Wir haben daher vorerst versucht, die vier proteinogenen Amine aufzusuchen, deren Wirkung vielleicht ähnlich ist der des Schilddrüsenextraktes. Wir haben daher den von Alkohol völlig befreiten Extrakt in Wasser gelöst und in Bicarbonat-alkalischer Lösung mit Benzoylchlorid behandelt. Wir enthielten einen Niederschlag, welcher aus Alkohol nicht krystallisierte. Wir konnten auch aus anderen Lösungsmitteln keine Krystalle bekommen. Wir konnten weder aus Aceton, noch Eisessig, noch Alkohol eine Krystallisation der Benzoylderivate bekommen.

Wir haben nun die Substanz mit Äther in zwei Teile getrennt, einen in Äther löslichen und einen in Äther unlöslichen. Wir haben nun beide Teile, den in Äther löslichen und den in Äther unlöslichen aus Alkohol zu krystallisieren versucht, ohne einen Erfolg zu erzielen. Wir haben hierauf beide Teile, sowohl den in Äther löslichen als auch den in Äther unlöslichen mit konzentrierter Salzsäure unter Rückflußkühlung auf dem Sandbade gekocht um die Benzoylgruppen wieder abzuspalten.

Hierauf wurde das Reaktionsprodukt mit Wasser verdünnt, mit Äther die abgespaltene Benzoesäure herausgeholt und die salzsaure, wässerige Lösung mehrfach auf dem Wasserbade zur Entfernung der überschüssigen Salzsäure unter Zusatz von Wasser abgedampft. Der abgedampfte Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit wässeriger Pikrinsäure gefällt, da die bekannten proteinogenen Amine der aromatischen Reihe mit Pikrinsäure charakteristische Verbindungen liefern. Wir erhielten eine minimale Menge einer Substanz, welche wir aus siedendem

Wasser umkrystallisierten, welche nur für eine Mikroanalyse ausreichte und deren Schmelzpunkt 232° war.

1,9 mg vakuumtrockene Substanz gaben 0,41552 ccm B 746, T 24°, das ist 24,67%. Für das Monopikrat des Imidazolyläthylamins $C_5H_9N_3 \cdot C_6H_3O_7N_{24}$. berechnet N_2 71%.

Der Schmelzpunkt unserer Verbindung stimmt ebenfalls mit dem in der Literatur angegebenen überein[1]).

Wir erhielten F 232° für den Beginn des Schmelzpunktes, welcher bei 233° endete, während *Barger* 232—234° angibt.

Wir konnten also von den supponierten proteinogenen Aminen hier minimale Mengen des Histamins nachweisen, in einer Ausbeute aus 3 kg frischer Schilddrüse, die gerade zur Bestimmung des Mikrostickstoffes nach Pregel und für zwei Schmelzpunkte genügte. In der Mutterlauge der Histaminpikratkrystalle konnten wir durch sehr vorsichtiges Neutralisieren mit etwas Natronlauge nach mehreren Stunden wieder eine kleine Krystallisation erhalten, die abgepreßt wurde und gerade für eine Schmelzpunktbestimmung ausreichte. Wir fanden den Schmelzpunkt dieses Pikrates mit 199°, welcher mit dem Schmelzpunkt des Pikrates des Tyramins (*p*-Oxyphenyläthylamin), der 200° ausmacht, übereinstimmt.

Aus der Mutterlauge konnten wir noch eine weitere Fraktion isolieren, ebenfalls in minimalen Mengen, welche den Schmelzpunkt 174° gab, der mit dem Schmelzpunkt des Pikrates des Phenyläthylamins übereinstimmt.

Wir haben also in dieser Fraktion minimale Spuren der drei proteinogenen Amine gefunden, welche in keinem Verhältnis zu der großen Menge Ausgangssubstanz standen und trotz der großen Frische des sonst einwandfreien Materials, doch auch durch Bakterienwirkung entstehen konnte. Jedenfalls kann man nicht sagen, daß diese positiven Befunde die Anschauung von *Abelin* stützen können, daß die proteinogenen Amine der aromatischen Gruppe der wirksame Anteil des eiweißfreien Schilddrüsenauszuges sind.

Es spricht vielmehr gegen diese Annahme, daß das Indolyläthylamin, welches seine Anwesenheit in Lösungen sehr leicht verrät, wenn man in der absolut eiweißfreien Lösung die Glyoxylsäure-Schwefelsäure-Reaktion anstellt, in ganz frischen Präparaten, die wir zu diesem Zwecke untersucht haben, nicht enthalten ist. Bei positivem Ausfall der Reaktion wäre erst zu untersuchen gewesen, ob es sich um die Base oder das Tryptophan selbst oder um eines seiner Derivate handelt, beim negativen Ausfall dagegen ist die Anwesenheit der ganzen Gruppe ausgeschlossen.

Wir haben auch die in Äther lösliche Partie der Benzoylverbindungen in gleicher Weise, wie oben beschrieben, hydrolysiert und das Hydrolyse-

[1]) S. *Barger:* Natural simple bases.

produkt ebenso aufgearbeitet, konnten aber in diesem Produkt keine von den Basen nachweisen.

Wir haben nun mit absolut frischem, eben aus dem Schlachthause geholten 400 g Pferdethyreoidea, die wir sofort in siedendes Wasser brachten, den Versuch wiederholt und zwar mit einer veränderten Methodik. Das wässerige Dekokt wurde rasch mit neutralem essigsaurem Blei ausgefällt, mit Schwefelwasserstoff entbleit, möglichst schnell im Vakuum eingeengt, mit Alkohol gefällt, von Salz und Gelatine befreit und aus der alkoholischen Lösung krystallisierte Inosit, wie oben beschrieben, in prachtvollen blumenkohlartigen Krystallen, die mit der bekannten Reaktion von *Scherer* nachgewiesen wurden. In diese alkoholische Lösung wurde nun alkoholische Pikrinsäure gegeben, welche sofort einen schön krystallisierten Niederschlag gab, der sich aus siedendem Wasser umkrystallisieren ließ und sich bei der Analyse als reines Kaliumpikrat erwies.

In der Mutterlauge vom Kaliumpikrat konnten wir keine Substanz finden, die mit einem Pikrat der bekannten proteinogenen Amine übereinstimmte. Wir fanden nur eine minimale Menge eines Pikrates, welches einen höheren Schmelzpunkt zeigte, als die charakteristischen Schmelzpunkte der Pikrate der proteinogenen Amine und zwar auf dem Block Maquenn 255—259° und wir konnten in diesem absolut einwandfreien Versuch auch nicht die in größeren Versuchen gefundenen Spuren der proteinogenen Amine nachweisen, daher erscheint die Ansicht, welche aus der Identität der Wirkung des eiweißfreien Schilddrüsenextraktes und der Wirkung der proteinogenen Amine auf die Identität der chemischen Verbindung schließt, durch die direkte Ermittlung der Existenz oder Nichtexistenz solcher Basen in absolut frischem Schilddrüsengewebe ausgeschlossen.

Der Verwendungsstoffwechsel pathogener Bakterien.

I. Mitteilung.

Von

H. Braun und **C. E. Cahn-Bronner.**

(Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung des Hygienischen Universitätsinstitutes in Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 18. April 1922.)

Einleitung.

Möglichst einfache, übersichtliche Ernährungsbedingungen für die einzelnen Bakterienarten zu schaffen, ist das Grundsätzliche unserer Untersuchungen. Um dies zu verwirklichen, werden den Bakterien nur die unentbehrlichen und unter diesen möglichst einfache chemische Körper, jedenfalls aber nur Verbindungen bekannter Konstitution als Nährstoffe zur Verfügung gestellt. So gelangt man zu Nährböden bekannter und konstanter Zusammensetzung, in denen ohne weiteres klarliegt, welche Substanz die Phosphor-, welche die Stickstoffquelle ist, und wo man die Kohlenstoff- und die Energiequelle zu suchen hat. Auf diese Weise wird eine größere Übersichtlichkeit des Bakterienstoffwechsels erreicht, und das zum Leben notwendige Zusammenspiel von Spaltungen und Synthesen wird durchsichtiger als es in unseren heute üblichen Nährböden mit ihren zahlreichen, komplizierten, nebeneinander vorhandenen Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiequellen der Fall ist. Deshalb ist die Züchtung von Bakterien in solchen einfachen künstlichen Nährböden bekannter chemischer Konstitution und die Kenntnis ihrer Wachstumsbedingungen unter durchsichtigeren Ernährungsverhältnissen für die gesamte Physiologie der Bakterien und insbesondere ihres Stoffwechsels bedeutungsvoll. Denn dieser selbst, häufig die einzige faßbare Lebensäußerung dieser Mikroorganismen, ist eines der wesentlichsten Objekte der bakteriologischen Forschung. Seine experimentelle Bearbeitung ist daher für unsere Kenntnisse der Lebensweise der Bakterien und ihrer Einwirkung auf andere Lebewesen notwendig. Schon für die Systematik bedürfen wir ja bei diesen Organismen ernährungsphysiologischer Merkmale und dürfen also aus derartigen Untersuchungen Ergebnisse in dieser Richtung erwarten; besonders

aber kommen sie für das Studium der Natur und der Entstehungsweise pathologisch bedeutsamer Ausscheidungsprodukte der Bakterien in Betracht. Es ist deshalb auffallend, daß auf diesem Gebiete in der medizinischen Bakteriologie nur gelegentlich Versuche gemacht wurden, obgleich doch auf anderen bakteriologischen Gebieten derartige Arbeiten seit langem systematisch durchgeführt sind und zu den bedeutsamsten wissenschaftlichen Aufschlüssen und praktischen Erfolgen geführt haben und auch schon in der allerersten Zeit bakteriologischer Forschung *Pasteur*[1]), nach ihm *Uschinsky*[2]) und dann in *Robert Kochs* Institut besonders *Proskauer* und *Beck*[3]) und *Capaldi* und *Proskauer*[4]) mit ausgedehnten derartigen Ernährungsversuchen auch an pathogenen Keimen den Anfang gemacht haben. Die bisherigen Methoden der medizinischen Bakteriologie, die Großes für die Auffindung und Systematik der Keime geleistet haben, machen gewiß andersartige Untersuchungsmethoden nicht überflüsisg; im Gegenteil, weil sie für wichtige Fragen an die Grenze ihrer Leistungsfähigkeit gekommen sind, bedürfen wir neuer, möglichst verschiedenartiger Arbeitsweisen. Es sind daher derartige ernährungsphysiologische Versuche z. B. an solchen Bakterien zu machen, deren kulturelle Unterscheidung in den üblichen Nährböden mißlingt. Man neigt häufig dazu, jeden Stoffwechselunterschied ohne weiteres als Artunterschied aufzufassen, weil die individuellen Schwankungen in der Befähigung der einzelnen Keime gleicher Art in unseren gebräuchlichen, komplizierten Nährböden wenig oder gar nicht zum Ausdruck kommen. Ganz anders aber unter den übersichtlichen Verhältnissen der einfachen künstlichen Nährböden. Hier kann man mit viel größerer Genauigkeit solche individuelle Differenzen und die Variationsbreite bestimmter Eigenschaften innerhalb einer Art feststellen und so zur Beantwortung der Frage kommen, welche ernährungsphysiologischen Eigenschaften bei der Artdifferenzierung brauchbar oder unbrauchbar sind.

Da es für die pathogenen Keime bisher an derartigen systematischen Voruntersuchungen mangelte, durfte man keine Mühe scheuen, zunächst an wohlbekannten Bakterien die Grundlage der Methodik aufzubauen, um eine Arbeitsmethode zu finden, mit der man die eben gezeichneten Ziele verfolgen könnte. Es wurde deshalb gerade die am besten durchforschte Bakteriengruppe, die Typhus-, Paratyphus-, Dysenterie-, Coli-Bacillen zu diesen Versuchen gewählt; zwar waren hier neuartige Resultate, z. B. in der Systematik, natürlich weniger zu

---

[1]) *Pasteur*, zit. nach *Friedberger* und *Reiter*, Handb. d. pathol. Mikroorg. von *Kolle* und *Wassermann*, Bd. 1. 1912.

[2]) *Uschinsky*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **14**, 10.

[3]) *Proskauer* und *Beck*, Zeitschr. f. Hyg. **18**. 1894.

[4]) *Capaldi* und *Proskauer*, Zeitschr. f. Hyg. **23**. 1896.

erwarten als bei schlechter bekannten Bakterienarten; aber die eingehende Kenntnis gerade dieser Keime ermöglichte es, mannigfaltige kulturelle und biologische Eigenschaften und die Beziehungen einer Art zu der anderen unter einfachen, übersichtlichen Ernährungsverhältnissen zu untersuchen, und so die Methode daraufhin zu prüfen, ob sie imstande ist, Einblicke zu gewähren, die uns anderswie verschlossen wären.

In unseren früher bereits mitgeteilten Untersuchungen[1]) wurde zunächst eine dieser Bakterienarten systematisch bearbeitet und dabei methodisch wichtige Beobachtungen gemacht. Von besonderer Bedeutung erweisen sich die folgenden vier Grundsätze, von denen nicht abgegangen werden darf: Exakte Versuche sind nur in *flüssigen Nährböden* möglich; denn nur dort ist die Forderung konstanter und bekannter chemischer Konstitution des Nährbodens, soweit dies überhaupt möglich ist, erfüllt. Es ist uns bisher nicht gelungen, den Agar-Agar so zu reinigen, daß er überhaupt keine für die Bakterien als Nährstoffe in Betracht kommenden Beimengungen mehr enthält. Die Herstellung fester Nährböden aus Kieselsäure aber ist für derartige Untersuchungen mit den dabei notwendigen mannigfaltigen Zusätzen zu den Nährlösungen viel zu umständlich. Zweitens ist zur Entscheidung der Frage, ob ein Bacterium aus den gebotenen Nährstoffen seine Leibessubstanz aufzubauen und sich zu vermehren imstande ist, die Züchtung in mehreren, hintereinandergelegten *Passagen* in demselben Nährboden unbedingt notwendig. Nur so ist man sicher, daß nicht Spuren des komplizierteren Nährbodens, z. B. der Nährbouillon, die bei der Beimpfung der künstlichen Nährböden mit den Bakterien übertragen werden, oder Reservestoffe in den Bakterienleibern, die aus der Zeit ihres Wachstums in anderen Nährböden stammen, hier die Vermehrung unterhalten. Oft sieht man nach der erstmaligen Beimpfung aus einer Nähr-Agarkultur eine Vermehrung im einfachen Nährboden, die meist nur gering, aber, wie wir erfuhren, bei manchen Bakterien sehr beträchtlich sein und gelegentlich sogar noch in der zweiten Passage auftreten kann; und trotzdem ist kein dauerndes Wachstum der betreffenden Bakterienart unter den gebotenen Ernährungsbedingungen möglich, denn beliebig lange lassen sich diese Keime in dieser Nährlösung nicht weiterzüchten. Und drittens hat sich herausgestellt, daß für das Wachstum in diesen Nährböden, in denen die Bakterien ausgedehnte Synthesen aus einfachen Substanzen vollziehen müssen, eine *vermehrte Sauerstoffzufuhr* von größter Bedeutung ist. In den meisten dieser Nährlösungen können sich Keime auch solcher Arten, die wir als fakultative Anaerobier kennen, überhaupt nur dann kräftig und dauernd vermehren, wenn ihnen besonders viel Sauerstoff zur Verfügung gestellt wird. Das läßt

[1]) *H. Braun* und *C. E. Cahn-Bronner*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **86**, H. 1. 1921.

sich erreichen durch Ausbreiten der Nährflüssigkeit zu einer flachen Schicht am Boden kleiner Erlenmeyerkölbchen. Unter den einfachsten Ernährungsbedingungen kommt es überhaupt erst bei diesem Kunstgriff zu sichtbarem Wachstum. Und schließlich ist bei bestimmten Arten eine *längere*, bis auf 3 Wochen ausgedehnte *Bebrütung* der Kulturen in den einfachen Nährböden notwendig; denn das Wachstum tritt häufig sehr spät auf; dabei kommt es in diesen Fällen nicht zu einer bald einsetzenden und ganz allmählich zunehmenden Trübung der Nährflüssigkeit, sondern es kann das Wachstum viele Tage, sogar 2 Wochen lang ausbleiben und dann mit einem Male kräftige Vermehrung einsetzen. Die Beachtung dieser Tatsache, die uns zunächst entgangen war, hat die Ergebnisse mancher Versuche geändert.

Bei den von anderer Seite veröffentlichten Untersuchungen sind diese methodischen Gesichtspunkte entweder alle oder zum Teil unberücksichtigt geblieben; es ergeben sich deshalb Widersprüche, und die Resultate sind nicht vergleichbar. Auf die wichtigsten dieser Veröffentlichungen wird bei der Besprechung der einzelnen Versuche hingewiesen werden.

Für den Paratyphus B-Bacillus genügen nach unseren früheren Untersuchungen einfache künstliche Nährböden, die als unentbehrliche Nährstoffe nur Kochsalz, Kaliumbiphosphat, Ammoniak und einfache Kohlenwasserstoffverbindungen, z. B. Milchsäure, enthalten. Daraus vermögen diese Bakterien dauernd ihr Körpereiweiß aufzubauen, trotzdem wichtige als Protoplasmabestandteile geltende Elemente, wie z. B. Schwefel und Magnesium, fehlen, oder nur in den trotz der getroffenen Vorsichtsmaßnahmen unvermeidbaren Spuren vorhanden sind. Es ist ersichtlich, daß in diesen Nährböden der Stoffwechsel anders ablaufen wird, als etwa in einer Nährbouillon. Nur knappe Energievorräte stehen für die Assimilation aus wenigen einfachen Verbindungen zur Verfügung, während in der Bouillon energiereiche Substanzen verschiedenster Natur vorhanden sind. Das erhöhte Sauerstoffbedürfnis ist die unmittelbare Folge dieser besonderen energetischen Beanspruchung der mit einfachen Substanzen ernährten Keime. Es stellte sich sogar heraus, daß die Paratyphus B-Bacillen und andere fakultative Anaerobier unter diesen Ernährungsbedingungen ohne freien Sauerstoff überhaupt nicht wachsen können. So konnte die Bedeutung des Stoffwechsels für die Entbehrlichkeit und Unentbehrlichkeit des Sauerstoffes[1]) untersucht und *damit Beobachtungen gemacht werden, die nur in einfachen übersichtlichen Nährböden und nicht in den üblichen Nährsubstraten gewonnen werden* konnten; es ist das also ein erstes Ergebnis dieser ernährungs-physiologischen Versuche mit ihrer besonderen Methodik gewesen.

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **86**, H. 5. 1921.

Auch über die Ernährungsbedingungen anderer pathogener Bakterien haben wir schon früher einige Mitteilungen[1]) gemacht. Es sind, meist in Übereinstimmung mit den Angaben von *Capaldi* und *Proskauer*[2]), *A. Fischer*[3]), *van Loghem*[4]) und *Kisch*[5]) z. B. zwischen den Paratyphus B- und Coli-Bacillen einerseits und den Paratyphus A-Bakterien und manchen Stämmen von Typhusbacillen andererseits prinzipielle ernährungs-physiologische Unterschiede zutage getreten. Dabei waren aber auch innerhalb der gleichen Art, so z. B. bei Typhus- oder Shiga-Kruse-Bacillen, derartige Differenzen zu beobachten. Und die jetzige Fortführung und Erweiterung dieser Versuche dient neben der Untersuchung der Ernährungsbedürfnisse und der synthetischen Fähigkeiten der einzelnen Arten in erster Linie den ernährungs-physiologischen Schwankungen innerhalb einer Art und der verschiedenen Befähigung der einzelnen Stämme. Außerdem soll dort, wo sich dazu Gelegenheit bietet, untersucht werden, wie es sich mit der einen oder anderen besonderen Eigenschaft der jeweils untersuchten Bakterien (fakultative Anaerobiose, Toxinbildung) unter den einfachsten Ernährungsbedingungen verhält.

Bevor aber mit der Wiedergabe der Versuche begonnen werden kann, sind technische Ausführungen über die angewandte Methodik unerläßlich. Wir fühlen uns veranlaßt, die Versuchstechnik ausführlicher zu besprechen, weil wir die Erfahrung machen mußten, wie mühsam die systematische Ausarbeitung einer Methodik und wie außerordentlich bedeutsam gerade hier die Technik der Versuche für die Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen ist. Die allmählich erreichten Verbesserungen in der technischen Durchführung haben uns gelegentlich genötigt, den Beobachtungen eine andere Deutung, als wir sie früher mitgeteilt haben, zu geben. So finden auch Widersprüche unter den Angaben der verschiedenen Autoren meist ihre Erklärung durch die ungleichartige Methodik. Geringfügig erscheinende Änderungen in der Versuchstechnik können zu ganz verschiedenen Schlußfolgerungen zwingen.

Die Versuchstechnik.

Die Versuchstechnik richtet sich nach den in der Einleitung besprochenen Grundsätzen dieser Untersuchungen und sucht diese, soweit das möglich ist, zu verwirklichen. Die möglichste Ausschaltung aller unbekannten Beimengungen aus den Nährböden erfordert *möglichst reines Wasser* und die *reinsten* erhältlichen *Substanzen*. Das mindeste, was für das Wasser verlangt werden muß, ist doppelte Destillation in Glasgefäßen und Aufbewahrung in Jenaer Glas. Für die ersten, früher mitgeteilten Versuche, in denen zunächst der Beweis erbracht werden mußte, daß die Bakterien tatsächlich von so wenigen und einfachen Substanzen dauernd ihr Leben fristen können, wurde das Wasser in Bergkrystallgefäßen

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **86**, H. 3. 1921.

[2]) l. c.

[3]) *A. Fischer*, Vorlesung über Bakterien. Jena 1903.

[4]) *van Loghem*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **57**. 1911.

[5]) *Br. Kisch*, Zentralbl. f. Bakteriol. **82**. 1919.

destilliert, um so auch Glasbestandteile möglichst auszuschließen; für spezielle Fragen, wie z. B. die Bedeutung der Natrium- oder Kaliumionen für das Wachstum der Bakterien, kann natürlich darauf nicht verzichtet werden. Für die jetzigen Fragestellungen aber haben wir diese Vorsicht für unnötig gehalten, da gewöhnliche Glasgefäße bei so ausgedehnten Versuchen doch nicht zu umgehen waren, und wir haben deshalb die mögliche Anwesenheit dieser Spuren von gelösten Glasbestandteilen in Rechnung gesetzt. Auch mußten wir uns für diese Untersuchungen mit den reinsten, durch Kauf erhältlichen Salzen und sonstigen chemischen Verbindungen begnügen; wir sind uns bewußt, daß die grundsätzliche Forderung nach absolut reinen chemischen Substanzen die eigene Prüfung resp. Herstellung der benutzten chemischen Körper verlangt, sobald nach einer Übersicht über die verschiedenerlei Fähigkeiten der einzelnen pathogenen Bakterien, wie ihn unsere Versuche geben sollen, einzelne speziellere Fragestellungen zu bearbeiten sind. Wir haben in den untersuchten Fällen verunreinigende Beimengungen, z. B. von Sulfat oder Magnesium, chemisch nicht nachweisen können; aber wir wissen, daß gelegentlich umgekehrt Bakterien feiner als chemische Reagentien die Gegenwart geringster Mengen von bestimmten Substanzen anzeigen können. — Besondere Sorgfalt ist außerdem natürlich der Reinigung aller mit den Kulturflüssigkeiten in Berührung kommender Glasgefäße zu widmen.

Für die *Zusammensetzung der Nährböden* kommen frühere Versuche[1]) in Betracht, die ergeben hatten, daß die Ansprüche der verschiedenen Bakterienarten nicht nur bezüglich der Qualität, sondern auch der Quantität der Nährstoffe unterschiedlich sein können (so z. B. bei Paratyphus B- und Colibacillen oder Paratyphus B- und Typhusbacillen). Deshalb darf bei vergleichenden Versuchen auf Ausnützbarkeit bestimmter Verbindungen deren prozentuale Menge nicht zu gering bemessen sein. Andererseits aber wurde beobachtet, daß solche Substanzen, die in starken Konzentrationen die Bakterien schädigen, bei dem besonders gearteten Stoffwechsel in diesen einfachen Nährböden schon in so geringen Verdünnungen das Bakterienwachstum beeinträchtigen können, in denen sie bei den sonst üblichen Bouillonnährböden noch keine erkennbare Wirkung entfalten. Deshalb dürfen die Konzentrationen auch nicht zu hoch sein, so z. B. wenn Traubenzucker oder Glycerin als Kohlenstoffquellen benützt werden. Dazu kommt, daß Stoffwechselprodukte der Bakterien, welche die Keime schädigen, z. B. Säuren, natürlich desto störender werden, je mehr von dem Ausgangsmaterial, aus dem sie gebildet werden, vorhanden ist. Auch hierbei ist die Empfindlichkeit der Keime in den einfachen Nährböden größer als z. B. in einer Bouillon. — Weiterhin ist an chemische Umsetzungen der als Nährstoffe eingebrachten Substanzen untereinander zu denken, besonders da die Nährböden im Dampf sterilisiert werden müssen. Deshalb sind solche Körper, die beim Erhitzen miteinander reagieren, getrennt zu sterilisieren, und die Lösungen erst nach dem Erkalten zusammenzugießen. Gelegentlich sind Ausfällungen auch in der Kälte nur dadurch vermeidbar, daß man mit den Konzentrationen der betreffenden mineralischen Nährstoffe soweit zurückgeht, bis die Lösung klar bleibt. So haben wir z. B. früher beträchtliche Zusätze von Magnesiumsulfat, Calciumchlorid, Eisensulfat zu carbonathaltigen Nährböden gemacht und dadurch natürlich Niederschläge bekommen; diese blieben am Boden der Flaschen, und zum Versuch wurde von der überstehenden klaren Flüssigkeit entnommen. Das ergab zwar, wenn gleiche Gewichtsmengen eingehalten wurden, bei jeder Herstellung die gleichen konstanten Verhältnisse, doch war störend, daß es nicht immer zu übersehen war, wieviel von anderen in dem Nährboden befindlichen Substanzen, z. B. dem Ammonium, ebenfalls in unlösliche Form gebracht worden war. Es wurden deshalb in diesen Versuchen die Zusätze von Magnesiumsulfat, Calcium-

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **86**, H. 1 u. 3. 1921.

chlorid und Eisensulfat so vermindert, daß wir von Magnesiumsulfat höchstens 0,005%, von Calciumchlorid und Eisensulfat nur Spuren (je 1 Tropfen aus 0,01 proz. Lösungen auf 100 ccm Nährboden) gaben, und so gar keine oder ganz minimale Ausfällungen entstanden.

Von besonderer Bedeutung ist die *Reaktion der Nährböden*. Manche Bakterien, z. B. Typhus- und Shiga-Kruse-Bacillen, zeigten sich in diesen einfachen Nährböden in viel stärkerem Maß gegen geringe Schwankungen des Alkaligehaltes empfindlich als in den üblichen Nährsubstraten. Wir haben die Reaktion durch Überschuß von Normalsodalösung über den Lackmusneutralpunkt hinaus eingestellt. Sie darf in diesen Nährböden für die meisten Bakterien nicht über einen Gehalt von 0,7% Normalsodalösung hinausgehen, kann aber darunter bleiben; in den Fällen, wo ein geringerer Sodazusatz eine Niederschlagsbildung verhindern konnte, haben wir uns ohne Schaden für das Bakterienwachstum unter der Grenze von 0,7% gehalten. Saure Reaktion ist aber ebenfalls sorgfältig zu vermeiden. Die früher von uns hergestellten Nährböden enthielten als Phosphorverbindung Kaliumbiphosphat; dieses hat den Nachteil, daß man recht viel Natriumcarbonat braucht, um es zu neutralisieren, und in den Nährböden, in denen die Soda ausgeschlossen werden sollte, recht viel Kali- oder Natronlauge nötig war; die Lauge aber beeinträchtigt unter diesen besonderen Verhältnissen die Vermehrung der Bakterien auch in geringen Mengen viel stärker als in einer Bouillon. Wählt man statt des primären Phosphates das sekundäre, so stört dessen schwach alkalische Reaktion, weil diese, sobald die übrigen Zusätze neutral reagieren, zur Einstellung des Lackmusneutralpunktes einen Säurezusatz notwendig macht. Wir haben deshalb häufig das primäre und sekundäre Salz im Verhältnis 1 : 4 gemischt und so eine schwach alkalische Reaktion ohne Sodazusatz bekommen, die für das Bakterienwachstum günstig war. In den Angaben über die Zusammensetzung der einzelnen Nährböden ist dies der Kürze halber als „Phosphatgemisch“ bezeichnet. Wenn die Sterilisation in einzelnen Teilen nötig war, so wurde jeder von diesen für sich neutralisiert und dann durch 1stündiges Erhitzen im Dampf keimfrei gemacht. Nach dem Erkalten wurden sie zusammengegossen und dann 1000 Teilen dieser Nährlösung 7 Teile einer vorher sterilisierten Normalsodalösung beigefügt.

Diese fertigen Nährböden wurden nun vor der Beimpfung in 50 ccm fassende Erlenmeyerkölbchen in Mengen von etwa 4 ccm eingefüllt, so daß die Flüssigkeitsschicht ungefähr 0,5 cm hoch und so die *Sauerstoffzufuhr* bei der ausgedehnten Oberfläche und geringen Tiefe besonders groß war.

Bei der *Beimpfung der Kölbchen* ist zwischen der erstmaligen Einsaat in diese Nährböden aus den üblichen Nährsubstraten und der Fortzüchtung von Passage zu Passage im gleichen Nährboden zu unterscheiden. Was das erstere anbelangt, so darf die Einsaat nicht zu klein sein, da bekanntlich zahlreiche Keime bei einem weitgehenden Wechsel des Mediums abzusterben pflegen. Andererseits darf sie aber auch nicht so groß sein, daß dadurch bereits eine Opalescenz oder Trübung des nur wenige Kubikzentimeter betragenden Nährbodens entsteht und so, wenn diese unbemerkt bleibt, nach einiger Zeit der Bebrütung Vermehrung vorgetäuscht wird. Dazu kommt, daß mit den Keimen möglichst wenig Nährmaterial von einem Nährboden in den anderen übertragen werden soll. Es ist deshalb die erstmalige Beimpfung der künstlichen Nährböden ausschließlich von festen Nährböden, einer 24stündigen Nähragarkultur, aus vorzunehmen, und zwar in der Weise, daß man die Öse zuerst in die zu beimpfende Nährlösung taucht, damit sich eine Flüssigkeitslamelle in der Öse ausspannt, dann die Öse auf den Bakterienrasen auftupft, bis in der Lamelle eine deutliche Bakterienemulsion vorhanden ist; damit wird der künstliche Nährboden beimpft. Wie beträchtlich diese Einsaat ist, geht daraus hervor, daß eine Öse der frisch beimpften Nährlösung, auf ein Schrägnähragarröhrchen ausgestrichen, einen Rasen dicht beieinander liegender

Kolonien ergibt, wiewohl im hängenden Tropfen aus dieser Nährflüssigkeit nach der Beimpfung keine Bakterien zu sehen sind. Die späteren Versuche geben eine Erklärung dafür, warum eine solche Einsaat notwendig ist, um gleichmäßige Resultate zu erzielen. — Was nun die Übertragung der Keime von Passage zu Passage in den einfachen Nährböden betrifft, so genügen dazu bei kräftig gewachsener Kultur 1—3 Ösen. Bei einem solchen, den Nährboden stark trübenden Wachstum bewegt sich die Keimzahl, z. B. bei Paratyphus B-Bacillen, um 200 Milliarden Keime in 1 ccm Nährflüssigkeit. Es kann also bei dieser geringen Beimpfung schon in der 3. Passage als ausgeschlossen gelten, daß eine derartige Vermehrung durch Stoffe, die vom Nähragar stammen, unterhalten wird. Schwieriger sind diese Verhältnisse bei schwachem Wachstum der Keime in einfachen Nährböden zu beurteilen, wo es gelegentlich nur zu einer Opalescenz oder ganz geringen Trübung der Flüssigkeit kommt und im hängenden Tropfen nur der Rand desselben mit Bakterien besetzt, im Zentrum aber nur wenige Keime zu finden sind. Bei solchem kümmerlichen Wachstum genügt zur Weiterführung der Passagen die Beimpfung mit 2—3 Ösen aus der bewachsenen Kultur nicht, sondern es sind 6—8 Ösen notwendig; diese Einsaat in 4 ccm des frischen Nährbodens ist zwar, was die Zahl der lebenden Keime betrifft, nicht groß, aber wohl, was die Übertragung von Stoffwechselprodukten der Keime und von Leibesbestandteilen abgestorbener Bakterien anbelangt. Und diese könnten sehr anspruchslosen Bakterien eine ganz geringe Vermehrung gestatten, so daß es auch in der neu angelegten Passage wieder zu einer ganz leichten Trübung kommt; dies kann sich beliebig oft wiederholen. Für die Beantwortung der Frage, ob eine bestimmte, dem Nährboden zugesetzte Substanz als Nährstoff von den Bakterien verwertet wird, sind deshalb nur deutliche Trübungen der Nährflüssigkeit, d. h. beträchtliche Vermehrung der Keime, zu verwerten. In unserer ersten Veröffentlichung wurde jede sichtbare Vermehrung, auch wenn sie nur zur Opalescenz des Nährbodens führte, sobald sie in Passagen fortführbar war, als Wachstum aus den wenigen bekannten Substanzen betrachtet. Wir sind im Laufe der Untersuchungen aus obigen Gründen mit der Deutung der Versuche vorsichtiger geworden (vgl. Proteus, Cholera, Pyocyaneus).

Die *Bebrütung* bei 37° muß sich, wie schon betont, über lange Zeit ausdehnen, bis man zu dem Schlusse berechtigt ist, daß die Bakterien die gebotenen Substanzen nicht als Nährstoffe benützen können. Alle unsere Kulturen, in denen kein Wachstum auftrat, sind 21 Tage bebrütet worden. Dabei müssen die Kölbchen natürlich, um beträchtliche Konzentrationsänderungen zu vermeiden, vor Austrocknung möglichst geschützt werden; es genügt, sie in einen großen Behälter, dessen Boden mit wassergetränkter Watte belegt ist, aufeinander zu bauen und so in den Brutschrank zu stellen.

Die *Vermehrung* der Bakterien gibt sich an der Trübung des vorher wasserklaren Nährbodens kund. Nicht immer kann man aus der Stärke dieser Trübung auf die Menge der herangewachsenen Bakterien schließen; denn es kommt gelegentlich, z. B. infolge des durch die Bakterien gebildeten Alkalis, zu Niederschlägen, die bei der einfachen Betrachtung nicht immer von der Trübung durch Bakterien zu unterscheiden sind, weil auch diese sich bei stärkerem Wachstum allmählich sedimentieren. Erst die Untersuchung im hängenden Tropfen oder die Keimzählung zeigt, daß zwei ganz verschieden getrübte Kulturen gleiche Zahl von Keimen enthalten können.

Die einzelnen Passagen sind natürlich dauernd auf *Reinkultur* der eingesäten Keime zu prüfen. Die Gefahr der Verunreinigung ist trotz der Verwendung flüssiger Nährböden nach unseren Erfahrungen nicht groß, denn die einfachen Nährböden bieten vielen Keimen und, wie wir früher zeigen konnten, besonders den grampositiven — um solche handelt es sich meistens bei zufälligen Verunreinigungen —,

schlechte Wachstumsbedingungen. Am Schlusse jeder Passagenreihe ist die kulturelle und gegebenenfalls auch serologische Identifizierung der darin enthaltenen Keime nötig.

Agarhaltige feste Nährböden haben wir, wie oben bereits erwähnt, für die Ernährungsversuche unter aeroben Verhältnissen überhaupt nicht verwendet, sie wurden höchstens zu Ergänzungsversuchen für besondere Zwecke herangezogen. Denn gelegentlich sind Bakterien auf diesen festen Nährböden gewachsen, während sie sich in derselben Nährlösung ohne Agarzusatz nicht vermehren konnten. Das beweist, daß der Agar trotz der von uns versuchten Reinigung unbekannte chemische Beimengungen enthielt, welche den Bakterien als Nährstoffe dienten. Über die Technik der Züchtung in einfachen Nährböden unter Sauerstoffausschluß wird später bei den betreffenden Versuchen zu sprechen sein.

I. Teil.

Der Verwendungsstoffwechsel der Typhus- nnd Paratyphus B-Bakterien.

a) Über das Vorkommen von ammoniakassimilierenden Typhusstämmen.

van Loghem[1]) hat zuerst beobachtet, und die Untersuchungen von *Kisch*[2]) haben es bestätigt, daß es Typhusstämme gibt, die mit Ammoniak als einziger Stickstoffquelle auskommen können. Hingegen hatten frühere Arbeiten, z. B. von *Capaldi* und *Proskauer*[3]) und von *A. Fischer*[4]) ergeben, daß die Typhusbacillen im Gegensatz zu Bacterium coli organische Stickstoffverbindungen zum Wachstum nötig haben. Die dadurch angeschnittene Frage nach den synthetischen Fähigkeiten der Typhusbazillen soll deshalb im folgenden systematisch untersucht werden. Gibt es wirklich unter den Typusbacillen Stämme mit so weitgehend verschiedener assimilatorischer Fähigkeit?

Als einfache künstliche Nährlösung wurde ein Nährboden gewählt, der Ammoniak als einzige Stickstoff- und Milchsäure als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle enthielt; denn dieser Milchsäure-Ammoniaknährboden, wie wir ihn der Kürze halber bezeichnen wollen, eignet sich, wie oben besprochen, besonders gut zur Züchtung von ammoniakassimilierenden Keimen. Er war folgendermaßen zusammengesetzt: 0,5% Kochsalz, 0,2% Kaliumbiphosphat, 0,6% Ammoniumlactat und die zur schwach alkalischen Reaktion nötige Menge Natriumcarbonat. 80 Typhusstämme von 64 verschiedenen Typhuspatienten wurden nun daraufhin geprüft, ob sie in diesem Nährboden in Passagen zu wachsen vermögen. Bei 62 Stämmen von 52 Patienten kam es zu keiner Vermehrung der eingesäten Keime, auch nach 21tägiger Bebrütung war die Nährlösung noch völlig klar. 18 Stämme von 12 Patienten dagegen vermochten sich in diesem einfachen Nährboden zu vermehren. Nach der Beimpfung aus einer Schrägnähragarkultur dauerte es mindestens 48 Stun-

[1]) l. c.
[2]) l. c.
[3]) l. c.
[4]) l. c.

den, bis sichtbares Wachstum auftrat. Im Verlauf mehrerer Tage kam es dann zu einer kräftigen Trübung des Nährbodens, unter dem Mikroskop sah man im hängenden Tropfen massenhaft schlanke Stäbchen, von denen sich meist nur vereinzelte ziemlich langsam durchs Gesichtsfeld bewegten. Impfte man durch Übertragung von drei Ösen Passage auf Passage im gleichen Nährboden weiter, so dauerte es jeweils meist 2 bis 3 Tage, bis es wiederum zur Trübung kam. Manche Stämme aber wuchsen nach der erstmaligen Beimpfung des künstlichen Nährbodens schwerer und langsamer an; so vergingen manchmal 5—7 Tage, bis es zum sichtbaren Wachstum gekommen war. Es konnte dann der wasserklare Nährboden tagelang unverändert durchsichtig bleiben, bis plötzlich binnen 1- oder 2 mal 24 Stunden eine deutliche, schwach-milchige Trübung entstand, ja man sah diese gelegentlich erst am 9. Tage auftreten. Waren aber die Bakterien einmal in dem einfachen Nährboden angewachsen, so ging die Vermehrung in den weiteren Passagen meist schneller vor sich, doch konnte auch da ein sichtbares Wachstum tagelang auf sich warten lassen. Langsamere oder schnellere Vermehrung ist Eigentümlichkeit der einzelnen Stämme und hängt nur in ganz geringem Maße von der Größe der Einsaat ab. Gelegentlich kam es auch einmal vor, daß diese Stämme gar nicht anwuchsen, wobei jedoch die Wiederholung des Versuches Vermehrung zeigte. Es ist deshalb zur Entscheidung der Frage, ob ein Stamm unter so einfachen Bedingungen Ammoniak assimilieren kann, ein mehrmaliges Versuchen und eine langdauernde Bebrütung notwendig.

Sind nun vielleicht die ammoniakassimilierenden Typhusstämme anspruchsloser gewordene und an künstliche Nährböden gewöhnte alte Laboratoriumsstämme? Unter den geprüften Kulturen waren acht Stämme, die seit Jahren im Laboratorium gehalten werden. Keiner von diesen ist im Milchsäure-Ammoniaknährboden gewachsen. Im Gegenteil waren alle 18 ammoniakassimilierenden Stämme frisch aus dem Menschen gezüchtet. Weiterhin konnte man daran denken, daß vielleicht bei der üblichen Anreicherung in Rindergalle der eine Typ von Typhusbacillen, bei Züchtung in Bouillon oder auf Endoagar der andere Typ zum Nachweis gelangt. Eine Sichtung der Fälle ergab, daß sowohl die ammoniakassimilierenden wie die nichtammoniakassimilierenden Stämme auf die eine oder andere Art durch Galleanreicherung aus Blut oder auf Endoagar aus Stuhl oder Urin gewonnen worden waren. *Und es zeigte sich, daß ein Typhuskranker offensichtlich entweder nur den einen oder den anderen Typ von Typhusbacillen in sich beherbergt.* Denn in neun Fällen wurde öfters aus demselben Patienten aus Blut, aus Stuhl oder Urin und mit zeitlichen Abständen von wenigen Tagen bis zu 11 Wochen Typhusbacillen isoliert und jedesmal bei ein und demselben Patienten entweder nur ammoniakassimilierende oder nichtassimi-

lierende Stämme gezüchtet. Entsprechend fand sich auch einmal bei zweien einige Wochen nacheinander erkrankten Mitgliedern derselben Familie beide Male der ammoniakassimilierende Typ von Typhusbacillen. Die zu diesen Untersuchungen herangezogenen Typhusstämme wurden der Reihenfolge nach, so wie sie im Laboratorium aus dem eingesandten Untersuchungsmaterial isoliert wurden, auf ihre Ammoniakassimilation geprüft, und zwar in der Zeit von September 1920 bis Oktober 1921; und es soll in diesem Zusammenhange nicht unerwähnt bleiben, daß die 12 durch den anspruchslosen Typhusbacillus verursachten Krankheitsfälle so in die Zahl der 52 durch den anspruchsvolleren Typhusbacillus hervorgerufenen Erkrankungen eingesprengt waren, daß drei Fälle innerhalb 8 Wochen im Herbst 1920, sieben Fälle innerhalb 17 Tagen im Februar 1921 und nur zwei Fälle später vereinzelt aufgetreten sind. Es war also eine Häufung der durch den einen Typ verursachten Krankheitsfälle zu konstatieren; ob sie eine gemeinsame Infektionsquelle hatten, konnten wir nicht ermitteln. Wir haben also nicht beobachten können, daß beide Typen von Typhusbacillen in demselben Patienten nachgewiesen wurden, im Gegenteil traten sie getrennt, jeder für sich, wie zwei verschiedenartige Erreger auf. Dabei waren unter den aus Frankfurt a. M. und einigen Städten der Umgebung stammenden Fällen während der Zeit der Untersuchungen die ammoniakassimilierenden Typhusstämme erheblich seltener als der anspruchsvollere Typ von Typhusbacillen.

Diese verschiedenen Typhusstämme erscheinen also schon nach den bisherigen Feststellungen in ihren synthetischen Befähigungen grundverschieden. Und die eine anspruchslosere Form gleicht in ihrer Fähigkeit der Ammoniakassimilation im Milchsäure-Ammoniaknährboden dem Paratyphus B-Bacillus. Es entstand deshalb die Frage: Sind vielleicht diese anspruchslosen, aus Typhusfällen gezüchteten Bakterien gar keine Typhusbacillen, trotzdem sie bei der üblichen bakteriologischen Diagnostik kulturell Typhusbacillen gleichen und durch Typhusimmunserum agglutiniert werden?

Oette[1]), *Wagner*[2]), *Loewenthal* und *Seligmann*[3]), *Petterson*[4]), *Loewenthal*[5]), *Ohno*[6]), *Tsakalotos*[7]) haben nämlich Paratyphus B-Stämme beschrieben, die aus Traubenzucker kein Gas zu bilden vermögen. In ihren kulturellen Eigenschaften ähneln sich dann also derartige Paratyphus B-Bacillen und Typhusbacillen. Dazu kommt, daß in

[1]) *E. Oette*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **68**, H. 1. 1913.
[2]) *G. Wagner*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **71**. 1913.
[3]) *Loewenthal* und *Seligmann*, Berl. klin. Wochenschr. 1913, Nr. 6.
[4]) *Petterson*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **82**. 1919.
[5]) *Loewenthal*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **83**. 1919.
[6]) *Ohno*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **75**. 1915.
[7]) *Tsakalotos*, Schweiz. med. Wochenschr. 1921, Nr. 11.

Übereinstimmung mit den Beobachtungen *van Loghems*[1]) einige von unseren als ammoniakassimilierende Typhusstämme angesprochenen Kulturen, die Lackmusmolke zum Umschlag brachten, womit also in kultureller Beziehung die Ähnlichkeit zwischen den ammoniakassimilierenden Typhusstämmen und gaslosen Paratyphus B-Stämmen noch vergrößert wurde. Es war deshalb der Gedanke nicht von der Hand zu weisen, ob es sich bei diesen im Milchsäure-Ammoniaknährboden wachsenden Stämmen etwa um Gärtnerbazillen, deren Gasbildungsvermögen verloren gegangen ist, handelt. Denn damit wäre in Anbetracht der bekannten serologischen Gemeinsamkeiten zwischen Typhus- und Gärtnerbacillen auch die Agglutination dieser fraglichen Bakterien durch Typhusimmunserum in Einklang zu bringen.

Zur Entscheidung dieser Frage sollen deshalb Paratyphus B-Bacillen, gaslose Paratyphus B-Bakterien, Gärtnerbacillen, die ammoniakassimilierenden und die ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme in ihren kulturellen Eigenschaften und zwar hauptsächlich in ihren synthetischen Fähigkeiten, dann aber auch in ihrem sonstigen biologischen Verhalten miteinander verglichen werden.

b) Über das Verhalten der ammoniakassimilierenden und nichtammoniakassimilierenden Typhusstämme in Lackmusmolke.

Zunächst wurde das eben bereits angedeutete Verhalten dieser beiderlei Typhusstämme in *Petruschky*scher Lackmusmolke verfolgt und mit dem der Paratyphus B-Bacillen verglichen; denn es wird häufig für die Typhusdiagnose auf eine als typisch betrachtete weinrote Färbung und fehlende Trübung dieses Nährbodens Wert gelegt. *van Loghems*[2]) Angabe, daß die ammoniakassimilierenden Typhusstämme die Lackmusmolke bläuen, konnte im wesentlichen bestätigt werden. Es wurden zu diesen Versuchen acht ammoniakassimilierende und elf nichtammoniakassimilierende Typhusstämme ausgewählt und in *Petruschky*sche Lackmusmolke (*Kahlbaum*) eingeimpft, von welcher 4 ccm in Reagenzröhrchen abgefüllt waren. Nach 24 Stunden hatten alle 19 Stämme die Lackmusmolke gerötet, wobei aber bereits auffiel, daß ein Teil der ammoniakassimilierenden den Nährboden stärker trübte als die übrigen; am 3. Tage, gelegentlich auch etwas später, bewirkten dann diese kräftig sich vermehrenden Stämme einen Umschlag über Violett nach Blau. Der andere, größere Teil der ammoniakassimilierenden Typhusstämme brachte jedoch die Lackmusmolke nicht zum Umschlag, sondern verhielt sich wie die nichtammoniakassimilierenden. Diese letzteren führten nur zu einer Rötung des Nährbodens, die sich auch nach 6wöchiger Bebrütung, während welcher die Röhrchen durch Plastillinverschluß vor

[1]) l. c.
[2]) l. c.

Verdunstung geschützt waren, nur unwesentlich verstärkte, ohne daß es aber zu einer Bläuung kam. Nur bei einem Stamm haben wir nach 2 Wochen Alkalibildung auftreten sehen; wir kommen auf diese Beobachtung in anderem Zusammenhang später zurück.

Es wurde nun versucht, ob bei einer Verstärkung des Wachstums durch vermehrte Sauerstoffzufuhr vielleicht auch die bisher kein Alkali bildenden Typhusstämme die Lackmusmolke zum Umschlag brächten. Bei der Züchtung in flacher Flüssigkeitsschicht wurde zweifellos das Wachstum aller Typhusstämme beschleunigt und verstärkt, die ammoniaknichtassimilierenden führten zu einer intensiveren Rötung, ein Farbumschlag aber trat auch nach 14 Tagen nicht ein. Bei den ammoniakassimilierenden Stämmen war die Beschleunigung des Wachstums noch deutlicher, einer von ihnen zeigte regelmäßig nach 48 Stunden schon alkalische Reaktion, andere am 2. oder 3. Tage; auch hierbei bildeten nicht alle diese Stämme Alkali.

Bei diesen Untersuchungen waren die Resultate mit verschiedenen Lieferungen der *Petruschky*schen Lackmusmolke nicht ganz gleich; manche ammoniakassimilierenden Stämme zeigten in der einen Umschlag, in einer anderen nicht. Der uns in diesem Zusammenhang interessierenden Frage, mit welchem chemisch-physiologischen Vorgange bei diesen Bakterien der Umschlag der Lackmusmolke im Zusammenhang zu bringen ist, konnte ohnehin in diesem Nährboden unbekannter Zusammensetzung nicht näher getreten werden. Es wurde deshalb die natürliche *Petruschky*sche Lackmusmolke verlassen, und die Versuche in der von *Seitz*[1]) angegebenen künstlichen „Lackmusmolke" bekannter und konstanter chemischer Zusammensetzung fortgesetzt. Ihre Bestandteile sind: 0,5% Kochsalz, 0,05% Dinatriumphosphat, 0,1% Ammoniumsulfat, 0,2% Natriumcitrat, 2% Milchzucker, 0,04% Traubenzucker, 0,005% Wittepepton, 0,025 % Azolithmin in destilliertem Wasser. Dieser Nährboden wurde zu 10 ccm in Reagenzröhrchen und zu 4 ccm in Kölbchen von 50 ccm Rauminhalt abgefüllt und somit das Wachstum unserer Stämme sowohl in hoher wie in flacher Flüssigkeitsschicht geprüft.

Die *Seitz*sche Lackmusmolke hat sich in den Laboratorien deshalb nicht einbürgern können, weil das Wachstum mancher Bakterien für praktisch-diagnostische Zwecke darin zu langsam vor sich geht; so pflegt der Paratyphus B-Bacillus meist erst nach 3mal 24 Stunden umzuschlagen und die Mehrzahl der Typhusstämme bewirkt erst nach 2—4 Tagen eine schwache Rötung, manche lassen sie sogar 5 Tage lang unverändert. Da ist der Kunstgriff der flachen Schicht ein willkommenes Hilfsmittel, diesen *Seitz*schen Nährboden mit seinem großen Vorteil einer konstanten Zusammensetzung brauchbar zu machen. Bei verstärkter Sauerstoffzufuhr bewirkt der Paratyphus B-Bacillus bereits innerhalb der ersten 24 Stunden alkalische Reaktion. Typhus- und Paratyphus A-Bacillen führen am 1. oder 2. Tag zu deutlicher Rötung bei klarer Nährflüssigkeit.

[1]) *Seitz*, Zeitschr. f. Hyg. 71. 1912.

Tritt nun auch in dieser künstlichen Lackmusmolke ein Umschlag durch die ammoniakassimilierenden Typhusstämme ein? In *hoher* Flüssigkeitsschicht schlagen einige von ihnen nach ungefähr 14tägiger Bebrütung um, während es bei anderen nur zu intensiver Rötung und mäßiger Trübung kommt. Von den nichtammoniakassimilierenden Stämmen hat auch nach 6wöchiger Bebrütung keiner alkalische Reaktion hervorgerufen. In *flacher* Schicht tritt der Umschlag bei den betreffenden ammoniakassimilierenden Typhusstämmen schneller, etwa am 5. Tage ein, und auch solche, die in hoher Flüssigkeitsschicht keine Bläuung hervorrufen, können sich jetzt kräftig vermehren und Alkali bilden; aber auch hierbei ist es nicht bei allen ammoniakassimilierenden Stämmen zur Bläuung der „Lackmusmolke" gekommen. Die weiteren Versuche zeigen, daß trotzdem zwischen diesen die Lackmusmolke rötenden und bläuenden ammoniakassimilierenden Typhusstämmen keine prinzipiellen Unterschiede bestehen.

Wir suchten uns über die Bedeutung des Peptonzusatzes für den Reaktionsumschlag zu orientieren und stellten uns deshalb eine *Seitz*sche Lackmusmolke ohne Pepton her und ließen gleichzeitig das Azolithmin weg, da man nicht wissen konnte, ob die Bakterien nicht diese Verbindung zu ihrem Aufbau mitverwenden. So erhielten wir einen Nährboden mit Ammoniak als einziger Stickstoffquelle und zwei verschiedenen Kohlenstoffverbindungen, Zitronensäure und Traubenzucker, — den Milchzucker, der von den hier geprüften Bakterienarten nicht angegriffen wird, behielten wir bei, um, abgesehen von der Entfernung des Peptons und Azolithmins möglichst wenig zu ändern. In diesem Zitronensäure-Traubenzucker-Ammoniaknährboden wuchsen die Paratyphus B-Bacillen in flacher Schicht innerhalb 24 Stunden zu dichter milchiger Trübung des Nährbodens heran. Der im Milchsäure-Ammoniaknährboden nicht wachsende Typ von Typhusbacillen hat sich auch hier während einer dreiwöchigen Bebrütung nicht vermehren können; die ammoniakassimilierenden Typhusstämme sind dagegen sämtlich gewachsen, nur viel langsamer als die Paratyphus B-Bacillen; es dauerte mindestens 5, gelegentlich sogar 9 Tage, bis eine sichtbare Trübung des Nährbodens auftrat. Die Reaktion war zunächst schwach sauer, wurde aber später bei *allen* diesen Stämmen alkalisch. Enthielt dieser Nährboden das Azolithmin, so trat darin bei allen ammoniakassimilierenden Typhusstämmen übereinstimmend, nur entsprechend der verschiedenen Wachstumsgeschwindigkeit früher oder später, zuerst eine Rötung und dann eine Bläuung auf. Es bewirkten also hierin auch diejenigen ammoniakassimilierenden Stämme, die in *Petruschky*scher und *Seitz*scher Lackmusmolke keine Alkalibildung hervorgerufen hatten, einen Farbumschlag nach Blau.

Danach ist es also nicht das Pepton, welches die Alkalibildung bedingt, sondern es sind die Stoffwechselprodukte dafür verantwortlich

zu machen, welche aus Ammoniumsulfat und Natriumcitrat entstehen, während die Spaltung der geringen Traubenzuckermenge die anfängliche Säuerung hervorruft. *Es geht hier also bei Züchtung in flacher Schicht und unter den gewählten Ernährungsbedingungen Ammoniakassimilation und Bläuung der künstlichen „Lackmusmolke" parallel.*

Nach Maßgabe der besprochenen Versuche verhindert sogar bei manchen Stämmen die geringe Peptonmenge den Farbumschlag. Es tritt dies gerade bei den Stämmen in die Erscheinung, die sich in diesem Nährboden nur sehr langsam vermehren. Zu einer Erklärung dieser Beobachtung können uns zwei Tatsachen dienen: Erstens sind in einfachen künstlichen Nährböden, wie es ja auch die künstliche Lackmusmolke ist, die Typhusbacillen, wie spätere Versuche zeigen, gegen saure Stoffwechselprodukte besonders empfindlich, so daß es dabei leicht zu Wachstumshemmung oder gar Abtötung der Keime kommt. Zweitens dauert es bei den ammoniakassimilierenden Typhusstämmen meist tagelang, bis ihre Vermehrung aus Ammoniak und Zitronensäure beginnt; auch darüber wird später ausführlich zu sprechen sein. Außerdem wurde eben festgestellt, daß erst bei der Verwertung des Ammonium- und Zitronensäuresalzes das Alkali gebildet wird. Ist nun Pepton in geringer Menge zugegen, so greifen die Typhusbacillen zuerst dieses und den Traubenzucker an, und es kommt infolge der Traubenzuckerspaltung zur Säurebildung: die künstliche Lackmusmolke wird rot. Da nun die Verwertung von Ammoniumsulfat und Natriumcitrat erst viele Tage später einsetzt, so fehlt die der Säuerung des Nährbodens entgegenwirkende Alkalibildung, und die tagelang anhaltende saure Reaktion schädigt die Keime derart, daß Entwicklungshemmungen auftreten können. Infolgedessen kommt es in diesen Fällen überhaupt nicht dazu, daß das Ammoniak assimiliert und Alkali gebildet wird. Fehlt dagegen das Pepton, und ist das Ammoniumsulfat die einzige Stickstoffquelle, so beginnt das Wachstum der Bakterien erst mit der Ammoniakassimilation, so daß den sauren Stoffwechselprodukten aus der Traubenzuckerspaltung gleich eine Alkalibildung entgegenwirkt, und es nicht so leicht zur Entwicklungshemmung der Keime kommt. Es tritt dann der *geringen* Traubenzuckermenge entsprechend eine *vorübergehende* Rötung und nachher eine intensive Bläuung mit starker Trübung des Nährbodens auf.

Das vielfach als charakteristisch betrachtete Verhalten der Typhusstämme in Lackmusmolke ist also für die einzelnen Typen verschieden. In der älteren Literatur finden sich recht zahlreiche Angaben über Bläuung der Lackmusmolke durch Typhusbacillen; diese sind in der sorgfältigen Arbeit von *Seitz*[1]) zusammengestellt. Es ist durchaus wahrscheinlich, daß manche dieser Autoren den ammoniakassimilierenden Typ

[1]) l. c.

von Typhusbacillen in der Hand hatten. Es gleichen sich also in der natürlichen und künstlichen Lackmusmolke Paratyphus B-Bacillen und manche ammoniakassimilierenden Typhusstämme weitgehend, und sind nur in der Schnelligkeit ihres Wachstums verschieden.

Um die Stellung der ammoniakassimilierenden Typhusstämme zu den Paratyphus B-Bacillen weiter zu untersuchen, sind wir zur vergleichenden Beobachtung ihrer synthetischen Fähigkeiten und Ernährungsbedürfnisse in einfachen künstlichen Nährböden übergegangen.

c) Vergleichende Untersuchungen über die Ernährungsbedingungen der ammonikassimilierenden und nichtammoniakassimilierenden Typhusbacillen und der Paratyphus B-Bakterien.

Die synthetischen Fähigkeiten der Paratyphus B-Bacillen und der nichtammoniakassimilierenden Typhusstämme sind in unseren früheren Mitteilungen[1]) schon ausführlicher besprochen worden. Die Auffindung der ammoniakassimilierenden Typhusstämme hat gezeigt, daß das Arbeiten mit mehreren Stämmen wegen der schwankenden Verhältnisse durchaus notwendig ist. Deshalb sind die früheren Versuche durch Wiederholung mit anderen Stämmen ergänzt und durch Prüfung andersartiger Nährböden ausgebaut worden; dazu tritt die in der früheren Veröffentlichung in Aussicht gestellte, ausführliche Untersuchung der Ernährungsbedürfnisse der ammoniakassimilierenden Typhusstämme. Über Zahl und Art der zu diesen Versuchen benützten Stämme gibt folgende Zusammenstellung Auskunft:

Von ammoniakassimilierenden Typhusstämmen sind zu diesen Versuchen 9 frisch aus dem Menschen gezüchtete Stämme verwendet worden, darunter 2 Paare, die aus dem gleichen Patienten stammten. Davon wurden 3 Stämme in jedem besprochenen Nährboden geprüft, eine größere Zahl bis zu 9 nur in den Nährlösungen, in denen Schwankungen des Wachstums zu beobachten waren oder die uns eine besondere Wichtigkeit zu haben schienen.

Aus der Paratyphus B-Gruppe wurden 11 Stämme herangezogen. Unter diesen befinden sich 2 Gärtnerstämme und außerdem 2 Paratyphus B-Kulturen, die aus Traubenzucker kein Gas zu bilden vermögen. Diese verdanken wir der Freundlichkeit des Herrn Professor *Bitter* in Kiel und des Herrn Priv.-Doz. Dr. *Wagner* in Jena. Diese beiden von *Oette*[2]) und *Wagner*[3]) ausführlich beschriebenen Stämme stimmen serologisch und in den üblichen Laboratoriumsnährböden in jeder Beziehung mit Paratyphus B-Bacillen überein mit der Ausnahme, daß sie aus Traubenzucker und auch aus Mannit kein Gas zu bilden vermögen; sie sind aber, wie die genannten Autoren schon zeigten, trotzdem sehr wohl imstande, den Traubenzucker anzugreifen, und vermehren sich dementsprechend auch in einem künstlichen Nährboden, der Ammoniak als Stickstoff- und Traubenzucker als einzige Kohlenstoffquelle enthält, unter starker Säuerung der Flüssigkeit. Von diesen 11 Stämmen wurden 3 Paratyphus B-Stämme, ein Gärtnerstamm und ein gasloser Paratyphus B-Stamm in sämtlichen Nährböden geprüft, die

[1]) l. c.
[2]) l. c.
[3]) l. c.

übrigen Stämme dort, wo es bei der Besprechung der Versuche vermerkt ist. Alle Stämme mit Ausnahme der besprochenen gaslosen waren kulturell und serologisch typisch.

Von ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämmen haben wir 7 Kulturen ausgewählt, davon sind in den ammoniakhaltigen Nährböden einer, in den aminosäurehaltigen mindestens 3, in den wichtigsten alle geprüft worden. Die 2 alten Laboratoriumsstämme und 5 frisch aus Typhuskranken gewonnenen Kulturen waren ebenfalls kulturell und serologisch typisch.

Wenn bisher von ammoniakassimilierenden Typhusstämmen gesprochen wurde, so besagte dies soviel, daß sie ihr Körpereiweiß aus Ammoniak aufzubauen vermochten, wenn ihnen Milchsäure als Kohlenstoff- und Energiequelle geboten wurde. Jetzt sollen andere *organische Kohlenstoffverbindungen* daraufhin geprüft werden, ob sie sich für diese Bakterien als Ausgangspunkt der Assimilation eignen, wenn sie gleichzeitig die einzigen Energiequellen sind und als Stickstoffverbindung nur Ammoniak zur Verfügung steht. Von den übrigen anorganischen Nährbodenbestandteilen ist für die ammoniakassimilierenden Typhusstämme, wie bereits festgestellt, im Milchsäure-Ammoniaknährboden nur der Zusatz von Kochsalz und Phosphat notwendig. Ob aber bei diesen Stämmen die Beigabe von Sulfat, Magnesium- oder Eisensalzen wachstumbefördernd wirkt, muß erst untersucht werden. Beim Paratyphus B-Bacillus ist nach unseren früheren Versuchen eine Verbesserung seines Wachstums durch diese Zusätze nicht mit Sicherheit festzustellen, und nie konnte beobachtet werden, daß andere Nährstoffe etwa dann nicht verwertet wurden, wenn diese Salze fehlten. Für die ammoniakassimilierenden Typhusstämme ist dieses jetzt erst zu prüfen, und wir haben also allen den Nährböden, in denen ohne diese anorganischen Salze kein Wachstum auftritt, solche zuzusetzen. Erst dann ist der Schluß berechtigt, daß bei fehlendem Wachstum die Kohlenstoff- oder Stickstoffverbindung unverwertbar ist, weil dafür nicht der Mangel an Schwefel oder Magnesium verantwortlich gemacht werden kann.

So haben wir zunächst als einfachste organische Kohlenstoffverbindung die **Ameisensäure** gewählt: In einem Ameisensäure-Ammoniaknährboden, der 0,5% Kochsalz, 0,2% Phosphatgemisch, 0,005% Magnesiumsulfat, Spuren von Calciumchlorid und Eisensulfat, 0,5% Ammoniumsulfat und 0,5% Natriumformiat enthielt, sind vier geprüfte ammoniakassimilierende Typhusstämme auch nach 3 Wochen langer Bebrütung nicht gewachsen. Auch drei untersuchte Paratyphus B- und zwei Gärtner-Stämme konnten sich darin nicht vermehren; ebensowenig natürlich die anspruchsvolleren, im Milchsäure-Ammoniaknährboden nicht gewachsenen Typhusstämme. Daß dieser Nährboden an und für sich für Bakterienwachstum taugt, geht aus der langsamen Vermehrung des Bacillus pyocyaneus hervor, der darin, wenn auch kümmerlich, in Passagen züchtbar ist.

Wir sind deshalb zur **Essigsäure** übergegangen. Hierbei zeigte sich bereits ein Unterschied zwischen den zu vergleichenden Bakterien. Der Nährboden enthielt 0,5% Kochsalz, 0,2% Phosphatgemisch, 0,5% Ammoniumsulfat und 0,5% Natriumacetat. Darin ist von fünf ammoniakassimilierenden Typhusstämmen auch nach dreiwöchiger Bebrütung keiner gewachsen. Von den Paratyphus B-Bacillen hingegen konnten sich die meisten Stämme vermehren. Während dies in den in einer früheren Mitteilung angedeuteten orientierenden Versuchen bei kurzer Bebrütungsdauer nicht gelang, waren jetzt drei Paratyphus B-Stämme und ein Gärtnerbacillus in Passagen zum Wachstum zu bringen. Die Bakterien wuchsen sehr langsam zu mäßiger Trübung des Nährbodens heran und waren in der dritten Passage zum Teil ziemlich lebhaft beweglich. Zwei andere Paratyphus B-Stämme haben sich aber in diesem Nährboden nicht vermehrt. Wie zu erwarten war, konnten auch die im Milchsäure-Ammoniaknährboden nicht wachsenden Typhusstämme hier nicht gedeihen. Fügte man noch 0,05% Magnesiumsulfat und Spuren von Calciumchlorid und Eisensulfat hinzu, so wurden auch dadurch die vorher nicht gewachsenen Paratyphus B- oder Typhusstämme nicht zur Vermehrung gebracht. Wir sehen hier also bereits Unterschiede zwischen den Paratypus B- und den ammoniakassimilierenden Typhusstämmen, aber auch Schwankungen innerhalb derselben Art auftreten.

Es wurde dann die **Oxalsäure** geprüft, und zwar in vier verschiedenen Nährlösungen. Die erste enthielt 0,5% Kochsalz, 0,2% Kaliumbiphosphat, 0,6% Ammoniumoxalat und soviel Natriumcarbonat, daß die gewünschte schwach alkalische Reaktion entstand; der zweiten war außerdem 0,005% Magnesiumsulfat und Spuren Calciumchlorid und Eisensulfat zugesetzt. Die dritte Modifikation des Oxalsäure-Ammoniaknährbodens enthielt dieselben Mengen Kochsalz und Kaliumbiphosphat, 0,6% Ammoniumphosphat, 0,5% Natriumoxalat und die nötige Sodamenge, der vierten waren außerdem noch die üblichen Mengen Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Eisensulfat beigegeben. In keinem dieser vier Nährböden sind die drei geprüften ammoniakassimilierenden Typhusstämme gewachsen, ebensowenig der anspruchsvollere Typ der Typhusbacillen. Von 10 Stämmen der Paratyphus B-Gruppe dagegen haben sich sechs vermehren können; ihr Wachstum war sehr langsam, begann meist erst nach 2—5 Tagen und wurde auch nach längerer Bebrütung nicht kräftig. Die entstehende Trübung war nur schwach, doch waren die Bakterien in Passagen fortzüchtbar. Bei einzelnen Stämmen wurden auch hier trägbewegliche Stäbchen gefunden. Aber auch in diesen Nährböden sind nicht alle Paratyphus B-Stämme gewachsen, von den beiden gaslosen zeigte nur der eine ein ganz geringes Wachstum, das aber nicht in Passagen fortführbar war; ebenso

konnten sich die beiden Gärtnerstämme und ein Voldagsenstamm nicht vermehren.

Im **Milchsäure-Ammoniaknährboden** von der eingangs dieser Arbeit angegebenen Zusammensetzung wuchsen sämtliche geprüften ammoniakassimilierenden Typhusstämme und die 11 Paratyphus B-Stämme, doch fiel auch hier ein Unterschied zwischen ihnen auf. Während die Paratyphus B-Bakterien in jedesmal 24 bis höchstens 48 Stunden nach der Beimpfung die Nährböden getrübt haben, vermehrten sich die ammoniakassimilierenden Typhusstämme viel zögernder und zeigten die schon besprochene, bisweilen viele Tage lange Verzögerung des Wachtumsbeginnes; aber auch dann war die Vermehrung bei den meisten Stämmen nicht so kräftig, wie bei den Paratyphus B-Bacillen. Vergleicht man nach gleichzeitig vorgenommener Beimpfung 2 Tage später die mit den beiderlei Bakterienarten beimpften Kölbchen, so pflegen sämtliche Paratyphus B-Stämme üppig gewachsen zu sein, während von den Typhusstämmen noch kaum einer den Nährboden getrübt hat, und diese dann sehr verschieden langsam nacheinander doch noch zum Wachstum kommen. Geht die alkalische Reaktion auch nur verhältnismäßig wenig über den angegebenen Grad hinaus, so wird die Entwicklung der Typhusbacillen gestört oder bleibt ganz aus, während in demselben Nährboden die allermeisten Paratyphus B-Stämme noch, wenn auch nicht mehr so üppig, gedeihen. Der Zusatz von 0,005% Magnesiumsulfat, Spuren von Calciumchlorid und Eisensulfat bedingt in diesem Nährboden eine raschere Vermehrung der ammoniakassimilierenden Typhusstämme. Besonders dauert es nach der erstmaligen Beimpfung vom Nähragar nicht mehr so lange, bis die Stämme zu sichtbarer Vermehrung kommen. Ob dabei allein die Verwertung dieser Substanzen zum Aufbau des Bakterienleibes und nicht außerdem noch andere, z. B. physikalische Faktoren eine Rolle spielen, ist aus diesen Versuchen nicht zu entscheiden.

Bei der Prüfung der **Bernsteinsäure,** die wir mit Natriumcarbonat neutralisierten, haben wir uns zweier Modifikationen des Bernsteinsäure-Ammoniaknährbodens bedient; die erste enthielt 0,5% Kochsalz, 0,6% Ammoniumphosphat, 0,3% Bernsteinsäure, mit festem Natriumcarbonat neutralisiert, und dann einen Überschuß von 0,7% Normalsodalösung über den Lackmusneutralpunkt hinaus; die zweite war aus 0,5% Kochsalz, 0,2% Phosphatgemisch, 0,5% Ammoniumsulfat, 0,005% Magnesiumsulfat, Spuren Calciumchlorid und Eisensulfat und 0,5% Bernsteinsäure, die mit Natriumcarbonat neutralisiert war, zusammengesetzt. Fünf ammoniakassimilierende Typhusstämme konnten sich in diesen Nährböden nicht vermehren, wohl trat in seltenen Fällen nach der ersten Beimpfung vom Nähragar eine ganz geringe Opalescenz auf, doch konnten Passagen trotz oftmals wiederholter Versuche nicht erzielt werden.

Von den Paratyphus B-Bacillen hingegen sind alle sechs geprüften Stämme in zahlreichen Passagen gewachsen, darunter auch die beiden gaslosen und die Gärtnerbacillen; es ist dabei nach 24 Stunden das Wachstum im allgemeinen geringer als im Milchsäure-Ammoniaknährboden, wird aber nach 2—3 Tagen ebenso üppig. Der andere anspruchsvollere Typ von Typhusstämmen ist auch unter diesen Ernährungsbedingungen nicht gewachsen. Im Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden verhielten sich also die geprüften Typhusstämme anders wie die untersuchten Paratyphus B-Stämme. Es ist uns auch mit technischen Hilfsmitteln, die sich bei später zu besprechenden Gelegenheiten als bedeutungsvoll erwiesen haben, nicht geglückt, solche Typhusstämme in diesem Nährboden dauernd zum Wachstum zu bringen; bei sehr starker Einsaat vom Nähragarröhrchen, welche die Nährlösung stark trübte, und nachfolgender Bebrütung konnten keine Passagen aus dieser Bakterienemulsion im gleichen Nährboden erzielt werden; und beimpfte man den Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden nicht, wie es in unseren Versuchen, wo nichts anderes vermerkt ist, grundsätzlich geschah, vom Nähragar aus, sondern mit einigen Ösen einer gut gewachsenen Milchsäure-Ammoniaknährbodenkultur, so trat zwar zunächst geringe Vermehrung ein, die bei manchen Stämmen stärker war als nach der Beimpfung vom Nähragar, doch gelang es auch so nicht, mehrere Passagen hintereinander zu erzielen. Die Bedeutung dieser technischen Hilfsmittel geht aus den weiter unten zu besprechenden Versuchsergebnissen hervor. Es können also die Typhusbacillen *Bernsteinsäure* unter den Bedingungen unserer einfachen Nährgemische *nicht* zum Aufbau ihrer Leibessubstanz verwenden.

Auch die Oxybernsteinsäure, die **Äpfelsäure**, ist für die Paratyphus B-Bacillen eine sehr gute, für die ammoniakassimilierenden Typhusstämme dagegen eine sehr schlecht ausnützbare Kohlenstoffquelle. Die benützte Nährlösung enthielt 0,5% Kochsalz, 0,2% Phosphatgemisch, 0,5% Ammoniumsulfat und 0,5% Äpfelsäure, die mit pulverisierter Soda neutralisiert war. Von drei geprüften ammoniakassimilierenden Typhusstämmen sind zwei nicht regelmäßig und, wenn überhaupt, so nur sehr langsam und schwach gewachsen, doch waren sie dann unter allmählich kräftiger werdender Vermehrung in Passagen fortzüchtbar. Ein dritter Stamm konnte überhaupt nicht gedeihen. Übertrug man ihn vom Milchsäure-Ammoniaknährboden in den Äpfelsäure-Ammoniaknährboden, so zeigte er eine ganz geringfügige Vermehrung. Auch der Zusatz von Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Eisensulfat hat das Wachstum dieser Typhusstämme nicht verbessert. Die Paratyphus B-Bakterien aber wuchsen sehr kräftig und schnell, wobei einzelne Stäbchen lebhaft beweglich, andere unbeweglich waren. Der anspruchsvollere Typ der Typhusbacillen vermochte bei Gegenwart von Äpfelsäure so wenig wie

bei den vorher geprüften Verbindungen das Ammoniak zu verwerten.

Die Versuche wurden mit der Dioxybernsteinsäure, der **Weinsäure** fortgesetzt. Der Nährboden enthielt 0,5% Kochsalz, 0,2% Phosphatgemisch, 0,005% Magnesiumsulfat, Spuren von Calciumchlorid und Eisensulfat, 0,5% Ammoniumsulfat und 0,5% Weinsäure, die mit pulverisiertem Natriumcarbonat neutralisiert war. Von der Rechtsdrehung der benutzten Weinsäure haben wir uns überzeugt. In diesem Nährboden sind weder die ammoniakassimilierenden noch die ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme gewachsen. Aber auch die Paratyphus B- und Gärtnerbacillen, von denen wir sieben Stämme prüften, sind zum größten Teil gar nicht, zwei davon nur so schlecht gewachsen, daß zwar drei Passagen gelangen, aber das Wachstum in jeder erst in der 2. Woche auftrat und nur zu einer ganz geringfügigen Opalescenz des Nährbodens führte, wobei im hängenden Tropfen nur ganz wenige Stäbchen zu sehen waren.

Es steht dieses Resultat in Widerspruch zu den Angaben von *Pesch*[1]). Auch *Kisch*[2]) hat zwar mit weinsauren Salzen gearbeitet, daneben aber immer noch Traubenzucker als zweite Kohlenstoffquelle in den Nährböden gehabt, so daß seine Resultate hier nicht in Betracht kommen. *Pesch* hingegen gibt einen allerdings agarhaltigen Nährboden mit Weinsäure als einziger Kohlenstoff- und Ammoniak als einziger Stickstoffquelle als besonders günstiges Nährsubstrat für Paratyphus B-Bacillen an. Wir haben deshalb den Weinsäure-Ammoniaknährboden in mehrfachen Modifikationen hergestellt und haben verschiedene Mengen weinsauren Kaliums und weinsauren Natriums, die von verschiedenen Quellen bezogen waren, zugesetzt. Einer dieser Nährböden enthielt statt der 0,5% des obengenannten 1%, ein anderer 0,1% weinsaures Natrium, ein weiterer 0,5% weinsaures Natrium mit den üblichen Mengen Magnesiumsulfats, Calciumchlorids und Eisensulfats, der letzte war aus 0,5% Kochsalz, 0,2% Phosphatgemisch, den gewohnten Mengen Magnesiumsulfats, Calciumchlorids und Eisensulfats, 0,5% Ammoniumsulfat und 0,54% weinsaurem Kalium zusammengesetzt und zeigte damit die gewünschte Alkalescenz. Aber in keiner dieser Nährlösungen ist es zu anderen Beobachtungen gekommen, als sie oben beschrieben worden sind. Es ist uns daher nicht gelungen, den Widerspruch mit der Beobachtung von *Pesch* aufzuklären; es müßten denn in seinem Agar unbekannte Beimengungen vorhanden gewesen sein, die mit Weinsäure zusammen ein so gutes Wachstum bedingt haben, wie er es beschrieb.

Ein besonderes Interesse bot die dreibasische **Citronensäure,** besonders in Rücksicht auf später zu besprechende Versuche mit Coli- und Shiga-Kruse-Bacillen. Denn *Pesch*[3]) berichtet, daß sie von Paratyphus B-Bacillen sehr gut, von Colibacillen aber nicht als Kohlenstoffquelle benützt werden kann. Unser Citronensäure-Ammoniaknährboden enthielt die gewohnten Mengen von Kochsalz, Kaliumbiphosphat, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Eisensulfat, 0,6% Ammoniumsulfat,

[1]) *Pesch*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **86.** 1921.
[2]) l. c.
[3]) l. c.

0,6% Natriumcitrat und soviel Natriumcarbonat, als zur gewünschten schwach alkalischen Reaktion notwendig war. Dieser Nährboden eignet sich zur Züchtung der Paratyphus B-Bacillen in ganz besonderem Maße. Die Vermehrung aller elf Stämme wurde darin besonders üppig, und die Passagen waren nach 24 Stunden bereits deutlich gewachsen. Die im Milchsäure-Ammoniaknährboden nicht gewachsenen Typhusstämme kamen aber auch darin nicht zur Vermehrung. Beimpfte man nun diese Nährlösung mit den ammoniakassimilierenden Typhusstämmen, so blieb die Flüssigkeit zunächst tagelang klar. Die schon öfters erwähnte Wachstumsverzögerung tritt in diesem Nährboden ganz besonders deutlich zutage. Hier konnte man beobachten, daß die Nährflüssigkeit über eine Woche lang klar blieb und bei der jede 48 Stunden vorgenommenen Nachschau keine Spur von Wachstum sichtbar war, bis plötzlich am 14. oder 16. Tage eine rasch zunehmende Trübung auftrat, die durch Reinkultur der eingesäten Bakterien hervorgerufen war; gelegentlich allerdings blieb bei Stämmen, die sich sonst in diesem Nährboden vermehren konnten, das Wachstum überhaupt aus. Wo es aber auftrat, war es in zahlreichen Passagen fortführbar und ging fortschreitend schneller vonstatten, so daß z. B. in einem Fall, in dem das Anwachsen der Keime nach der Beimpfung vom Nähragar 16 Tage beansprucht hatte, die 4. Passage in 2 Tagen herangewachsen war. Zum Zwecke, die Ursache dieser Wachstumverzögerung zu erkennen, wurde der Citronensäure-Ammoniaknährboden in fester Form hergestellt; er enthielt die gleichen Bestandteile wie die flüssige Lösung und außerdem 2,5% vorher sorgfältig gewässerten Stangenagars. Auf Schrägröhrchen dieses Nährbodens wuchs der Paratyphus B-Bacillus in 24 Stunden zu einem dichten Rasen heran. Derselbe Nährboden wurde nun mit ammoniakassimilierenden Typhusstämmen beimpft, wobei die ganze Agar-Oberfläche mit den vom Nähragar abgenommenen Bakterien bestrichen und so mit dem Vielfachen der in die flüssigen Nährböden eingesäten Keime beimpft wurde. Nachdem 2—3 Tage lang, auch mit der Lupe, keine Kolonien sichtbar waren, entstanden gewöhnlich am 4. oder 5. Tage, gelegentlich erst später, vereinzelte große, weißliche Kolonien in weitem Abstand voneinander, ja manchmal überhaupt nur eine einzige solche. Dazwischen sah man unter dem Mikroskop eine größere Zahl winzig kleiner, durchsichtiger Kolonien, welche auch auf demselben agarhaltigen Nährboden *ohne* Citronensäure zu sehen waren; diese also verdanken ihre Entstehung entweder dem Verbrauch der Leibesbestandteile der bei dieser starken Beimpfung in großer Zahl benachbart liegenden abgestorbenen Keime oder dem trotz der Wässerung noch im Agar enthaltenen Beimengungen. Die großen weißlichen Kolonien, die bis zu 1 mm Durchmesser hatten, hielten wir zunächst für Verunreinigungen. Es stellte sich aber heraus, daß sie aus Typhusbacillen bestanden; und es

zeigte sich nun, daß diese Kolonien aus Keimen zusammengesetzt waren, welche besonders leicht im Citronensäure-Ammoniaknährboden weiter züchtbar waren. So gelang es von einzelnen ammoniakassimilierenden Typhusstämmen, die bei der üblichen Beimpfung des *flüssigen* Citronensäure-Ammoniaknährbodens vom Nähragar aus unregelmäßig oder gar nicht anwuchsen, auf diesem Umweg über die stark beimpften *festen* Citronensäure-Ammoniaknährböden durch Abstechen solcher isolierter weißer Kolonien in den flüssigen Nährboden zahlreiche hintereinander gelegte Passagen zu erzielen. Diese Versuche sind wohl so zu deuten, daß in derartigen Stämmen unter vielen Keimen nur ganz wenige die Fähigkeit haben, sich im Citronensäure-Ammoniaknährboden zu vermehren, so daß nur einzelne Kolonien auf dicht beimpften Citronensäure-Ammoniakagarnährboden entstehen. Bei der viel geringeren Einsaat in die flüssigen Nährböden aber können so wenige dieser zur Vermehrung aus Citronensäure und Ammoniak befähigten Keime eingeimpft werden, daß es erst nach vielen Tagen zu sichtbarem Wachstum kommt, oder gelegentlich die Vermehrung überhaupt ausbleibt. Hier also können wir zum erstenmal in diesen Versuchen eine ***verschiedene Befähigung der einzelnen Keime innerhalb desselben Stammes***, der selbst aus einer Kolonie hervorgegangen ist, beobachten. Wir kommen später ausführlich darauf zurück.

Des weiteren wurden Versuche mit einem Alkohol gemacht und das schon von *A. Fischer* und *van Loghem* benützte **Glycerin** gewählt. Der Nährboden enthielt die gewohnten Mengen Kochsalz, Phosphatgemisch, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid, Eisensulfat, 0,5% Ammoniumsulfat und 0,5% Glycerin. Vier daraufhin geprüfte Paratyphus B-Stämme wuchsen darin außerordentlich schnell und üppig und waren in zahlreichen Passagen fortzüchtbar. Die ammoniakassimilierenden Typhusstämme gediehen ebenfalls gut, bedurften aber auch hier einiger Tage, bis sichtbares Wachstum auftrat. Sie waren ebenfalls in Passagen fortzüchtbar, doch müssen diese angelegt werden, sobald das Wachstum zu deutlich sichtbarer Trübung des Nährbodens geführt hat, denn diese Kulturen sterben sehr schnell ab, wahrscheinlich infolge der sauren Stoffwechselprodukte, welche aus dem Glycerin entstehen. In diesen einfachen Nährböden besitzen die Bakterien, wie anderen Ortes[1]) ausführlich gezeigt werden konnte, allgemein gegen chemische und physikalische Schädigungen erhöhte Empfindlichkeit, so daß Wachstumshemmungen und Abtötung schon unter Bedingungen erfolgen können, bei denen noch keine schädigenden Einflüsse auf Bakterien des gleichen Stammes, die sich in Nährbouillon entwickelt haben, zu beobachten sind. Auch in diesen Versuchen geschah es mitunter, daß Passagen nicht gelingen wollten, auch wenn die gleichzeitige Beimpfung eines Nähragar-

[1]) *Cahn-Bronner*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **33**, H. 4/5. **1921**.

röhrchens noch die Anwesenheit von lebenden Keimen bewies. Hier haben wir damit zu rechnen, daß auch dann, wenn noch nicht alle Bakterien abgestorben sind, die Überlebenden doch in ihrer Vitalität geschädigt sind. Der in den bisher besprochenen Nährböden nicht zum Wachstum gekommene andere Typ der Typhusstämme vermochte auch bei Gegenwart von Glycerin das Ammoniak nicht zu assimilieren.

Daß die **Kohlenhydrate** in diesen einfachen Nährböden auch dann, wenn sie die einzige Kohlenstoff- und Energiequelle darstellen, gespalten und verwertet werden können, haben wir schon früher[4]) gezeigt. Paratyphus B-Bacillen wuchsen in einem Traubenzucker- oder Maltose-Ammoniak-, aber natürlich nicht in einem Milchzucker- oder Saccharose-Ammoniaknährboden. Auch die aus Traubenzucker kein Gas bildenden Paratyphus B-Stämme konnten sich, wie bereits vermerkt, im Traubenzucker-Ammoniaknährboden unter Säurebildung vermehren. Die ammoniakassimilierenden Typhusstämme gediehen, wie zu erwarten war, im Traubenzucker-Ammoniaknährboden, doch waren Passagen ziemlich schwer zu gewinnen; dies hat wiederum seinen Grund in den entstehenden sauren Stoffwechselprodukten und tritt hier deutlicher als beim Glycerin in die Erscheinung. Die mit den bisher besprochenen Kohlenwasserstoffverbindungen zur Ammoniakassimilation nicht befähigten Typhusstämme waren dazu auch bei Gegenwart der Kohlenhydrate außerstande. Ein daraufhin geprüfter Stamm konnte auch in einem Milchsäure-Ammoniaknährboden, der 0,5% Traubenzucker oder 0,5% Maltose als zweite Energiequelle enthielt, nicht wachsen.

Reiner Müller[1]), *Oette*[2]), *Wagner*[3]) haben verschiedene Kohlenhydrate und die ihnen zugehörigen Alkohole auf Säure- und Gasbildung durch Typhus- und Paratyphus B-Bacillen zum Zwecke der Differenzierung dieser beiden Arten untersucht und gefunden, daß z. B. aus **Arabinose** von Paratyphus B-Bacillen sehr wohl, von Typhusbacillen dagegen keine Säure gebildet wird. Wir haben deshalb einen Arabinose-Ammoniaknährboden hergestellt, der 0,5% Kochsalz, 0,2% Kaliumbiphosphat, 0,5% Ammoniumsulfat, 0,5% Arabinose und die nötige Menge Natriumcarbonat enthielt. Darin sind fünf geprüfte Paratyphus B- und ein Gärtnerstamm unter Säurebildung üppig in Passagen gewachsen. Dagegen haben sich weder die ammoniakassimilierenden, noch die nichtammoniakassimilierenden Typhusstämme vermehren können, auch nicht nach Zusatz der üblichen Mengen von Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Eisensulfat und 3 Wochen langer Bebrütung.

Wir haben so eine Reihe einfach gebauter Kohlenwasserstoffverbindungen auf ihre Eignung als Nährstoffe für zwei verschiedene Bakterien-

---

[1]) *R. Müller*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **58**. 1911.

[2]) [3]) [4]) l. c.

Tabelle I.

Die Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen durch Paratyphus B-, Gärtner-, ammoniakassimilierende und ammoniaknichtassimilierende Typhusbacillen bei Ammoniak als einziger Stickstoffquelle.

Kohlenstoffquelle:		Ameisensäure	Essigsäure	Oxalsäure	Milchsäure	Bernsteinsäure	Äpfelsäure	Weinsäure	Citronensäure	Glycerin	Traubenzucker	Arabinose
Stickstoffquelle:		Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak
Paratyphus B-Bacillen	Stamm 1	0	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+
	Stamm 2	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+
	Stamm 3	0	+	.	+	+	+	?	+	+		+
„Gaslose" Paratyphus B-Bacillen	Stamm 1		+	+	+	+		0	+	+	+	+
	Stamm 2	0	0	0	+	+		0	+		+	+
Gärtnerbacillen	Stamm 1	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+
Ammoniakassimilierende Typhusbacillen	Stamm 1	0	0	0	+	0	0+	0	+	+	+	0
	Stamm 2	0	0	0	+	0	0+	0	+	+	+	0
	Stamm 3	0	0		+	0	0+	0	+	+	+	0
	Stamm 4	0	0		+	0			+			
	Stamm 5				+	0			+			0
Ammoniaknichtassimilierende Typhusbacillen	Stamm 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Zeichenerklärung: + bedeutet Wachstum in zahlreichen Passagen. 0 bedeutet kein Wachstum. 0+ / +0 bedeutet, der betreffende Stamm ist in mehrmaligen Versuchen einmal gewachsen, ein anderes Mal nicht. 0+ bedeutet, daß er in der Mehrzahl der Versuche nicht gewachsen, +0, daß er in der Mehrzahl der Versuche gewachsen ist. Wo jeder Vermerk fehlt, sind die betreffenden Versuche mit dem Stamm nicht ausgeführt worden.

arten unter Verhältnissen untersucht, in denen sie die einzigen Kohlenstoff- und Energiequellen waren und Ammoniak als einzige Stickstoffverbindung zur Verfügung stand. Die Ergebnisse der bisher besprochenen Versuche sind in Tabelle I zusammengestellt; diese umfaßt eine Auswahl der zu den Untersuchungen benützten Stämme. Sie zeigt die Unterschiede zwischen den beiden Bakterienarten und außerdem die Schwankungen innerhalb der Art.

Die Verwertung von Nitrat als einzige Stickstoffquelle.

Die nächste Frage ist nun, in welcher anderen Verbindung als mit Wasserstoff der Stickstoff von diesen Bakterien assimiliert werden kann. Ehe man sich organischen Stickstoffverbindungen zuwandte, war das Nitrat zu untersuchen. Man hatte sich also Nährböden zusammenzusetzen, welche die notwendigen mineralischen Bestandteile, eine organische Kohlenstoffverbindung und Nitrat als einzige Stickstoffquelle enthielten. Ein solcher Milchsäure-Nitratnährboden, der 0,5% Kochsalz, 0,2% Kaliumbiphosphat, 0,5% milchsaures Natrium, 0,5% Kalium- oder Natriumnitrat und die nötige Menge Natriumcarbonat enthielt, gestattete den sechs geprüften ammoniakassimilierenden Typhusstämmen keine Vermehrung. Wenn auch gelegentlich in der ersten Passage im Laufe von 2—3 Wochen eine ganz geringfügige Trübung des Nährbodens auftrat, gelang es doch niemals, mehrere Übertragungen in demselben Nährboden vorzunehmen. Ganz ähnlich verhielten sich die acht geprüften Paratyphus B- und ein Gärtnerstamm. Bei den meisten fehlte auch nach 3 Wochen jegliche Vermehrung. Bei den beiden gaslosen und einem anderen Paratyphus B-Stamm trat nach längerer Zeit eine ganz geringe Trübung der Nährlösung auf, ohne daß Passagen zu gewinnen waren. Nur bei einem Stamm konnten bis zu vier Passagen erzielt werden, wobei sich aber jedesmal das Wachstum nur in einer ganz schwachen Trübung des Nährbodens kundgab und mikroskopisch nur wenige Stäbchen zu sehen waren. Auch die geprüften ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme waren außerstande, das Nitrat zu assimilieren. Die Zugabe von Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Eisensulfat hat keinem dieser Bakterien darin Wachstum erlaubt. Daß der Nährboden als solcher wohl imstande war, Bakterien als Nährsubstrat zu dienen, sofern sie nur unter diesen einfachen Verhältnissen denitrifizieren können, bewies das kräftige und rasche Wachstum des Bacillus pyocyaneus in diesem Nährboden. Es ist also weder den Typhus- noch den Paratyphus B-Stämmen gelungen, den Nitratstickstoff zum Aufbau ihrer Leibessubstanz zu verwerten; doch legte die geringe Vermehrung des einen Paratyphus B-Stammes die Frage nahe, ob die Energie beanspruchende Denitrifizierung vielleicht nur deshalb nicht

geleistet werden konnte, weil zu wenig Energiematerial vorhanden war. Es wurde deshalb die Milchsäure durch energiereichere und nachgewiesenermaßen gut ausnützbare organische Kohlenstoffverbindungen, 0,5% Citronensäure oder 0,5% Glycerin oder 0,5% Traubenzucker ersetzt. Aber auch so gelang diesen Bakterien die Nitratverwertung nicht. Im Traubenzucker-Nitratnährboden konnte überhaupt keine Vermehrung beobachtet werden, im Citronensäure- und Glycerin-Nitratnährboden traten zwar häufiger als mit Milchsäure und Nitrat Trübungen nach der erstmaligen Beimpfung dieser Nährböden vom Bouillonagar aus auf, doch sind mehrere Passagen auch darin nicht gelungen. Schließlich wurde geprüft, ob dieses negative Resultat vielleicht dadurch zu erklären sei, daß das Nitrat entwicklungshemmend wirkt, denn wir mußten, wie eben besprochen, im Auge behalten, daß derartige Ernährungsstörungen in einfachen künstlichen Nährböden schon bei solchen Verdünnungen der betreffenden giftigen Substanzen auftreten können, die in Bouillon noch nicht schädlich wirken. Aber der Hemmungsversuch zeigte, daß im Milchsäure-Ammoniaknährboden auch der Zusatz von 4% Natriumnitrat die Entwicklung der Paratyphus B-Bacillen noch nicht aufhielt. Wir wollten unser Resultat der schlechten oder fehlenden Ausnützung des Nitrats durch Paratyphus B-Bacillen deshalb etwas näher verfolgen, weil wir damit im Widerspruch zu *Kisch* stehen; er hat agarhaltige Nährböden verwendet, auf denen auch ohne Stickstoffquelle bereits ein ganz geringes Wachstum bemerkbar war; wir haben nun ebenfalls einen derartigen Nährboden hergestellt, der die oben angegebenen Mengen von Kochsalz, Kaliumbiphosphat, Natriumnitrat, Natriumlactat und Natriumcarbonat und außerdem 2,5% Agar enthielt. Darauf ist auch in unseren Versuchen der Paratyphus B-Bacillus in feinem Rasen gewachsen und war in Passagen fortzüchtbar. In einer Agar-Schüttelkultur dieses Nährbodens traten nach 48 Stunden kleine Kolonien unmittelbar unter der Oberfläche auf; aber auf demselben festen Nährboden wuchsen trotz vorheriger sorgfältiger Wässerung des Agars auch ohne Zusatz einer Stickstoffquelle die Paratyphus B-Bacillen in feinen, mit der Lupe deutlich sichtbaren Kolonien. Da außerdem dieselbe Nährlösung, die mit dem Agar vermischt, Vermehrung gestattete, ohne Agar in flacher Schicht kein Wachstum erkennen ließ, so müssen wir schließen, daß es hier im Agar vorhandene unbekannte wachstumsfördernde Stoffe sind, welche im festen Milchsäure-Nitratnährboden bei *Kisch* wie bei unseren Versuchen mit agarhaltigen Nährböden das Wachstum bedangen. Wir haben den Versuch mitgeteilt, um an diesem Beispiel zu zeigen, daß derartige ernährungsphysiologische Untersuchungen in exakter Form solange nur in flüssigen agarfreien Nährböden möglich sind, bis wir eine sicher arbeitende Methode der Agarreinigung haben.

Die Verwertung der Aminosäuren.

Die Versuche wurden mit **Glykokoll** als einziger verfügbarer Stickstoffkohlenstoff- und Energiequelle begonnen. Der Nährboden enthielt die üblichen Mengen Kochsalz, Phosphatgemisch, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid, Eisensulfat und 0,5% Glykokoll. Die ammoniakassimilierenden Typhusstämme sind in diesem Nährboden nicht gewachsen, ebensowenig die ammoniaknichtassimilierenden. Auch die Mehrzahl der Paratyphus B-Stämme und ein Gärtnerstamm konnten sich darin nicht vermehren; doch ist von dreien einer im Verlauf von einer Woche bis zur Opalescenz des Nährbodens und in weiteren Passagen kräftiger gediehen. Wir müssen also unsere früheren Angaben dahin ergänzen, daß es doch Paratyphus B-Stämme gibt, welche von Glykokoll allein ihre Leibessubstanz aufzubauen vermögen. Und bezeichnenderweise gehört dieser die Aminoessigsäure verwertende Paratyphus B-Stamm zu denen, welche imstande sind, von Ammoniak und Essigsäure zu leben. Bedeutet nun die Unfähigkeit der ammoniakassimilierenden Typhusstämme, sich von Glykokoll zu vermehren, daß sie diese Aminosäure nicht als Stickstoffquelle verwerten können? oder ist es die Energiearmut dieser Verbindung, welche das Wachstum nicht aufkommen läßt? Denn es waren doch gerade diese Stämme nicht imstande, die Essigsäure als einzige Energiequelle zu benutzen. Wir fügten also noch Milchsäure, eine sowohl für Typhus- wie Paratyphus B-Bacillen als ausreichend erkannte Energiequelle in der Menge von 0,5% milchsauren Natriums, dessen schwachsaure Lösung mit Natriumcarbonat neutralisiert war, hinzu, so daß also das Glykokoll jetzt nur als Stickstoffquelle zu dienen brauchte. Und daraufhin sind sowohl die sechs geprüften ammoniakassimilierenden Typhusstämme als auch die mit Glykokoll allein nicht gewachsenen Paratyphus B-Stämme, die ersten in etwa 3 Tagen, die letzten in 24 Stunden gewachsen und in Passagen fortzüchtbar gewesen. Dazu war der Zusatz des Magnesiumsulfats und des Calcium- oder Eisensalzes nicht nötig. Vier ammoniaknichtassimilierende Typhusstämme hingegen sind in diesem Nährboden, auch mit diesen mineralischen Bestandteilen, nicht gewachsen. Das **d-Alanin** erwies sich als ausreichender Nährstoff, auch ohne daß Milchsäure als zweite Energiequelle vorhanden war, und wenn die Bakterien aus dieser Verbindung allein ihren Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiebedarf decken mußten. Der Nährboden enthielt 0,5% Kochsalz, 0,2% Phosphatgemisch, 0,005% Magnesiumsulfat, die üblichen Mengen von Calciumchlorid und Eisensulfat und 0,5% Alanin. Darin sind sechs ammoniakassimilierende Typhusstämme nach 4—6 Tagen, andere noch langsamer bis zur kräftigen Trübung des Nährbodens herangewachsen. Fünf Paratyphus B-Stämme und der Gärtnerbacillus sind sehr rasch und üppig gediehen. Hierbei kommt also wohl der größere Energiegehalt des Alanins gegenüber dem

Glykokoll zum Ausdruck, und es erinnert das gute Wachstum dieser Bakterien mit der Aminopropionsäure an die Fähigkeit der gleichen Stämme, ihre Leibessubstanz aus Ammoniak und der Oxypropionsäure aufzubauen. Die ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme hingegen konnten den im Alanin gebundenen Stickstoff nicht benützen, denn die vier geprüften Stämme sind in diesem Nährboden auch nach Zusatz von 0,5% milchsaurem Natrium und den üblichen Mengen Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Eisensulfat nach 3 Wochen langer Bebrütung nicht gewachsen.

Die **Asparaginsäure** bot als Aminobernsteinsäure ein besonderes Interesse, weil es uns in den oben beschriebenen Versuchen nicht gelungen war, die ammoniakassimilierenden Typhusstämme im Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden zum Wachstum zu bringen. Sie wurde mit pulverisiertem Natriumcarbonat neutralisiert und dann zu 0,5% einem Nährboden zugesetzt, der außerdem die üblichen Mengen von Kochsalz, Phosphatgemisch, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Eisensulfat enthielt. Darin sind die ammoniakassimilierenden Typhusstämme zum Teil gar nicht, zum Teil schlecht und unregelmäßig gewachsen. Zwei davon waren trotz mehrfacher Versuche überhaupt nicht zum Wachstum zu bringen, sechs andere sind nach etwa einer Woche allmählich herangewachsen, und es ließen sich auch hintereinandergelegte Passagen erzielen; doch gelang es nicht regelmäßig, sie zur Vermehrung zu bringen. Demgegenüber sind die vier geprüften Paratyphus B-Stämme, unter denen sich auch die beiden gaslosen befanden, und ein Gärtnerstamm kräftig und in Passagen gewachsen, allerdings entsprechend der etwas schwierigeren Vermehrung mit Bernsteinsäure langsamer als mit Alanin. Wir sehen also, daß die Aminobernsteinsäure für die ammoniakassimilierenden Typhusstämme ein schlechter verwertbarer Körper ist, als die Aminopropionsäure, und es wird der Grund dafür in der schlechten Ausnützbarkeit des Bernsteinsäurerestes zu suchen sein. Immerhin hat (unter der Voraussetzung, daß unser Präparat wirklich absolut rein war), die Bindung des Ammoniakrestes an das Kohlenstoffatom die vorher unverwertbare Bernsteinsäure wenigstens für einige Stämme ausnützbar gemacht. Gab man Milchsäure hinzu, so wuchsen die ammoniakassimilierenden Stämme kräftig und in Passagen. Solange also die Aminosäure die einzige organische Substanz war, wurde sie gar nicht oder schlecht ausgenutzt. Denn dabei mußte sie zwecks Energiegewinnung mindestens zum Teil gespalten werden, und eben die Spaltung der Bernsteinsäure macht Schwierigkeiten. Wir haben also wohl anzunehmen, daß dies bei weiterer Energiezufuhr durch Milchsäure leichter gelingt, denn es fehlt uns an Anhaltspunkten dafür, daß die unveränderte Asparaginsäure, die in diesem Nährboden die einzige Stickstoffverbindung ist, als Ganzes zum Aufbau des Bakterieneiweißes verwendet wird. Die nichtammoniakassimilierenden Typhusstämme, die organisch ge-

bundenen Stickstoff brauchen, können nämlich auch in Milchsäure-Asparaginsäurenährboden nicht wachsen; alle sieben geprüften Stämme haben darin keine Vermehrung gezeigt. Beim **l-Leucin** liegen die Verhältnisse ähnlich wie beim Glykokoll. Auch diese Aminosäure ist wenig geeignet, den hier zu untersuchenden Bakterien ohne weitere Energiezufuhr als Ausgangspunkt der Assimilation zu dienen. Der Nährboden enthielt die üblichen Mengen von Kochsalz, Phosphatgemisch, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid, Eisensulfat und 0,5% l-Leucin. Die ammoniakassimilierenden Typhusstämme zeigten wohl zum Teil eine anfängliche geringe Vermehrung, waren aber nicht in Passagen züchtbar. Auch die .Paratyphus B-Bacillen konnten sich nicht in Passagen vermehren. Beim Leucin traten bereits Verschiedenheiten unter den uns zur Verfügung stehenden Proben dieses Körpers auf. Die obigen Resultate beziehen sich auf ein aus dem Laboratorium *Emil Fischers* stammendes und ein zweites von der Firma *Merck* geliefertes Präparat. Ein drittes unbekannter Herkunft erlaubte im Gegensatz zu diesen einem Teil der Paratyphus B-Stämme ein ganz geringes Wachstum, es sind von 7 Stämmen fünf in mehreren Passagen gediehen. Die ammoniakassimilierenden Typhusstämme konnten sich aber auch damit nicht vermehren. Sobald dem Leucinnährboden (l-Leucin *Merck*) Milchsäure beigefügt wurde, sind die 4 untersuchten ammoniakassimilierenden Typhusstämme und ebenso alle sieben Paratyphus B- und ein Gärtnerstamm rasch und kräftig in Passagen gewachsen. Fünf ammoniaknichtassimilierende Typhusstämme sind aber auch in diesem Milchsäure-Leucinnährboden nicht zur Vermehrung gekommen.

Mit **l-Tyrosin** haben wir nur einige orientierende Versuche gemacht, denn seine geringe Löslichkeit beeinträchtigte die Deutung der Züchtungsresultate, weil man nicht wußte, ob das Fehlen oder ein nur schwaches Auftreten des Bakterienwachstums auf die Schwierigkeit in der Ausnützung dieses Stoffes oder auf der zu geringen verfügbaren Quantität desselben beruht. Es löste sich das Tyrosin allerdings in unseren schwach alkalischen, mit den verschiedenen anderen Zusätzen versehenen Nährböden erheblich besser als im destillierten Wasser und fiel im Gegensatz zu unserer früher benützten 0,25 proz., in einer 0,1 proz. Lösung auch in der Kälte nicht mehr aus. In einem solchen Tyrosinnährboden mit 0,5% Kochsalz, 0,2% Phosphatgemisch, den üblichen Mengen Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Eisensulfat und 0,1% l-Tyrosin konnten weder Paratyphus B-Bakterien, noch die ammoniakassimilierenden Typhusstämme wachsen. Darin ist also nur $^1/_5$ der sonst üblichen Aminosäuremenge enthalten. Wir haben uns deshalb einen Alaninnährboden von der oben angegebenen Zusammensetzung, in dem Paratyphus B- und ammoniakassimilierende Typhusstämme gut gewachsen waren, hergestellt, der aber jetzt statt 0,5% ebenfalls nur 0,1% Alanin

enthielt, um zu prüfen, was diese Nährstoffverminderung für das Bakterienwachstum bedeutet. Die Paratyphus B-Bacillen konnten sich auch darin vermehren; die ammoniakassimilierenden Typhusstämme kamen aber nicht mehr zur Entwicklung. Dieser Versuch lehrte, daß das fehlende Wachstum aus Tyrosin nicht, wie wir das früher taten, als Zeichen der Unverwertbarkeit des Oxyphenylalanins als einziger Stickstoff- und Kohlenstoffquelle gedeutet werden muß, sondern daß man wenigstens für die ammoniakassimilierenden Typhusstämme damit zu rechnen hat, daß vielleicht zu wenig Nährmaterial zur Verfügung steht. Daß das Tyrosin angreifbar ist und als Stickstoffquelle dienen kann, geht daraus hervor, daß nach Zusatz von Milchsäure die Paratyphus B-Bacillen sich, wenn auch ziemlich kümmerlich, vermehren konnten. Drei ammoniakassimilierende Typhusstämme sind im Tyrosin-Milchsäurenährboden in einigen Passagen allerdings sehr langsam gewachsen; die ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme konnten sich auch in diesem Nährboden nicht vermehren.

Tabelle II gibt einen Überblick über die eben besprochenen Versuche mit Aminosäuren; sie enthält eine Auswahl der untersuchten Stämme.

Tabelle II. Die Verwertung einiger Aminosäuren durch Paratyphus B-, Gärtner-, ammoniakassimilierende und ammoniaknichtassimilierende Typhusbacillen. Die Stämme und ihre Bezeichnungen sind die gleichen wie die in der Tabelle I.

Kohlenstoffquelle:		Glykokoll	Milchsäure	Alanin	Milchsäure	Asparaginsäure	Milchsäure	Leucin	Milchsäure	Tyrosin	Milchsäure
Stickstoffquelle:			Glykokoll		Alanin		Asparaginsäure		Leucin		Tyrosin
Paratyphus B-Bacillen	Stamm 1	+	+	+		+		0	+	0	[illegible]
	Stamm 2		+	+		+			+	0	[illegible]
	Stamm 3	0	+	+				0	+		
Gaslose Paratyphus B-Bacillen	Stamm 1		+	+		+			+		
	Stamm 2	0	+	+		+		0	+		
Gärtnerbacillen	Stamm 1	0	+	+		+		0	+		
Ammoniakassimilierende Typhusbacillen	Stamm 1	0	+	+		+	+	0	+	0	[illegible]
	Stamm 2	0	+	+		+	+	0	+	0	[illegible]
	Stamm 3		+	+		+	+	0	+	0	[illegible]
	Stamm 4		+	+		+	+	0	+		
	Stamm 5		+			0	+				
	Stamm 6		+	+		0	+				
Ammoniaknichtassimilierende Typhusbacillen	Stamm 1	0	0		0		0		0		
	Stamm 2		0		0		0		0		
	Stamm 3		0		0		0		0		
	Stamm 4		0		0		0		0		

Zeichenerklärung: + bedeutet Wachstum in zahlreichen Passagen. 0 bedeutet kein Wachstum. $\left.\begin{matrix}0+\\+0\end{matrix}\right\}$ bedeutet, der betreffende Stamm ist in mehrmaligen Versuchen einmal gewachsen, ein anderes Mal nicht. 0+ bedeutet, daß er in der Mehrzahl der Versuche nicht gewachsen, +0, daß er in der Mehrzahl der Versuche gewachsen ist. Wo jeder Vermerk fehlt, sind die betreffenden Versuche mit dem Stamm nicht ausgeführt worden.

Schließlich wurde das **Tryptophan** geprüft. Diese Substanz bot ein ganz besonderes Interesse. Nach unseren früheren Untersuchungen[1]) ist dies die einzige Aminosäure, mit welcher die ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme wachsen, die in keinem der bisher besprochenen Nährböden zur Vermehrung gebracht werden konnten. Außerdem spielt das Tryptophan für anaërobes Wachstum eine besondere Rolle. Es standen uns nur relativ geringe Mengen dieser Substanz zur Verfügung, so daß wir nur mit wenigen Stämmen, einem Paratyphus B-, drei ammoniakassimilierenden und zwei nichtammoniakassimilierenden Typhusstämmen Versuche machen konnten. Die einzelnen Tryptophanpräparate waren als Bakteriennährstoffe *nicht* gleichwertig. Der Nährboden enthielt 0,5% Kochsalz, 0,2% Kaliumbiphosphat, 0,5% Tryptophan und die zur schwachalkalischen Reaktion nötige Menge von Natriumcarbonat. Bei unseren früher mitgeteilten Versuchen[1]) haben wir Tryptophan, das uns von Herrn Geh. Rat *Ellinger* zur Verfügung gestellt wurde, außerdem ein Präparat der Firma *Merck* und zwei andere unbekannter Herkunft benützt und bei allen vier Substanzen die gleichen Beobachtungen gemacht. Die Paratyphus B-Bacillen wuchsen in diesem Nährboden langsam und spärlich, aber in Passagen, die ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme dagegen nicht. Fügte man 0,5% milchsaures Natrium hinzu, so sind beide Arten üppig gewachsen. Für unsere jetzigen Versuche mit den ammoniakassimilierenden Typhusstämmen stand uns ein Präparat von Herrn Prof. *Neuberg*, dem wir auch bei dieser Gelegenheit bestens danken, zur Verfügung. Damit sind die ammoniakassimilierenden Typhusstämme üppig und in Passagen, ebenso die Paratyphus B-Stämme, aber auch die ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme gewachsen. Es war hier für diese letzteren also kein Milchsäurezusatz nötig. Ein später von den Grenzach-Werken bezogenes Tryptophan aber erlaubte zwar den Paratyphus B-Bacillen ein sehr spärliches, nach Milchsäurezusatz deutlicheres Wachstum, doch blieb die Vermehrung der ammoniakassimilierenden und nichtammoniakassimilierenden Typhusstämme aus; sie sind auch nach Zusatz von 0,5% Milchsäure oder 0,5% Traubenzucker mit dem Grenzacher-Tryptophan nicht gewachsen.

Diese tryptophanhaltigen Nährböden entsprechen nach unserer Ansicht nicht mehr den chemisch einwandfreien Bedingungen, wie wir sie als grundsätzlich für unsere Untersuchungen bezeichneten. Unsere Tryptophanpräparate sind nicht synthetisch dargestellt, und es ist nicht von der Hand zu weisen, daß sie einen wechselnden Gehalt an so geringen Beimengungen haben können, daß diese zwar nicht mehr chemisch nachweisbar sind, wohl aber für den Stoffwechsel der Bakterien noch in Betracht kommen könnten. Außerdem geht das Ver-

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **86**, H. 1, 3, 5, 1921.

dauungstryptophan bei der üblichen Reinigung zum Teil in racemisches über.

Wir baten Herrn Geheimrat *Ellinger*, bei 3 unserer Präparate, von denen uns noch geringe Mengen zur Verfügung standen, die Schmelzpunkte und die optische Aktivität zu bestimmen. Die Werte für die Schmelzpunkte waren 245—247°, 256°, 277°. Die Werte für die spezifische Drehung in $^1/_2$proz. wässeriger Lösung waren —40°,—23°, —26°; sie liegen also innerhalb der Werte, die von verschiedenen Beobachtern für „reines" Verdauungstryptophan angegeben werden, zeigen aber doch durch die erheblichen Abweichungen untereinander, daß Unterschiede im Grad der Reinheit vorhanden sein müssen.

Im Anschluß an diese Tryptophanversuche wurden noch einige **Indolderivate** untersucht. Dabei interessierte in erster Linie das Verhalten der ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme, die ja mit Ausnahme des Tryptophannährbodens in keinem der bisher besprochenen Nährlösungen gewachsen waren. Infolgedessen wurden mit diesen Substanzen, von denen uns wenige Zentigramme zur Verfügung standen, nur ein solcher ammoniaknichtassimilierender Typhus- und zum Vergleich ein Paratyphus B-Stamm in orientierenden Versuchen geprüft. Es handelte sich um die Frage: Ist das Indolalanin als solches zur Vermehrung dieser anspruchsvollen Typhusbacillen notwendig? Daß sie mit Alanin oder Alanin und Milchsäure nicht zu wachsen vermögen, wurde bereits oben besprochen. Es kann also nicht allein der Stickstoff der Alaninseitenkette des Tryptophans sein, der hier als Stickstoffquelle dient. Ist es der Jndolkern und das im Ring gebundene Stickstoffatom, welchem das Tryptophan seine besondere Bedeutung für die Ernährung dieser Bakterien verdankt? Wir haben zunächst versucht, ob eine Indolcarbonsäure das Tryptophan ersetzen kann. Der Nährboden enthielt außer den üblichen Mengen von Kochsalz, Kaliumbiphosphat, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid, Eisensulfat, 0,5% Indol-α-Carbonsäure und die nötigen Mengen Natriumcarbonat. Darin ist weder der Paratyphus B- noch der Typhusstamm gewachsen. Auch nach Zusatz von 0,5% Traubenzucker oder milchsaurem Natrium vermehrten sich diese Bakterien nicht. Selbst wenn wir außerdem 0,25% Asparaginsäure oder 0,5% Alanin beifügten, war kein Wachstum der Typhusbacillen zu erzielen, wohingegen die Paratyphus B-Bakterien natürlich gut gediehen, da sie von den zugesetzten Aminosäuren allein leben können. Auch eine Indoldicarbonsäure gestattete den beiden Bakterienarten keine Vermehrung. 0,5% Indol-$\alpha\beta$-dicarbonsäure als Stickstoff und Milchsäure als Kohlenstoffquelle waren nicht verwertbar. Möglicherweise war hier das Indol durch die angegliederten Seitenketten unverwertbar geworden. Wir haben deshalb das Indol selbst untersucht. Der oben angegebene Nährboden enthielt statt der Indolcarbonsäure 0,25% Indol und 0,5% Natriumlactat, wobei jedoch nach dem Erkalten der Lösung eine geringe Ausfällung entstand. Aber auch in diesem

Nährboden ist weder der Paratyphus B-, noch der Typhusstamm gewachsen. Wir haben diesem Indol-Milchsäurenährboden 0,25% Alanin beigefügt, so daß jetzt Indol und Alanin und eine ausnützbare Energiequelle (Milchsäure) gleichzeitig vorhanden waren. Darin wuchs, wie zu erwarten war, der Paratyphus B-Bacillus, da er von Alanin allein leben kann, der ammoniaknichtassimilierende Typhusstamm war aber nicht zum Wachstum zu bringen. Das Indolalanin war also weder durch die geprüften Indolderivate noch durch Indol plus Alanin ersetzbar. Dieses Resultat führt zu der Annahme, daß das Indolalanin als solches der Baustein für die Synthese dieser Typhusbacillen ist. Daß das Tryptophan im Stoffwechsel dieser Bakterien tatsächlich eine Rolle spielt, geht daraus hervor, daß sie bekanntlich aus Pepton Tryptophan bilden. Wenn also Versuche mit synthetischem Tryptophan die gleichen Resultate ergeben, wie mit den uns zur Verfügung stehenden Präparaten, so müssen wir annehmen, daß das Tryptophan für diese ammoniaknichtassimilierenden Typhusbakterien als vorgebildeter Baustein, der durch andere Aminosäuren nicht ersetzbar ist, zum Aufbau des Körpereiweißes verwendet wird.

Wir haben nun Versuche mit einigen *weiteren organischen Stickstoffverbindungen* gemacht. Sollte es wirklich nicht gelingen, andere Substanzen bekannter chemischer Konstitution zu finden, welche als Nährstoffe für diese ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme dienen könnten? Wir hofften dabei auf Körper zu stoßen, die leichter und mit größerer Sicherheit in reiner Form erhältlich sind, als das Tryptophan. Als einfachste derartige Verbindung haben wir den **Harnstoff** geprüft. In einem Nährboden aus 0,5%-Kochsalz, 0,2% Phosphatgemisch, 0,6% Harnstoff sind aber weder die ammoniakassimilierenden, noch die ammoniaknichtassimilierenden Typhus-, noch die Paratyphus B-Stämme gewachsen. Es fehlte darin an einer brauchbaren Energiequelle. Sobald 0,5% Milchsäure, 0,25% Natriumsulfat, 0,005% Magnesiumsulfat zugesetzt wurden, wuchsen in diesem Harnstoff-Milchsäurenährboden die fünf geprüften Paratyphus B-Stämme, darunter auch die beiden gaslosen, und zwei Gärtnerstämme. Auch von den ammoniakassimilierenden Typhusbacillen sind die meisten Stämme gewachsen: Von sieben geprüften Kulturen konnten zwei trotz wiederholter Versuche darin nicht zur Vermehrung gebracht werden, die übrigen fünf dagegen zeigten zwar nicht regelmäßiges Wachstum, doch gelang es nach mehrfacher Wiederholung, jeden dieser Stämme zum Anwachsen zu bringen, und sobald das gelungen war, von Passage zu Passage weiter zu züchten. Die geprüften ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme dagegen zeigten auch nach 3wöchiger Bebrütung keine Vermehrung. Es ist dies verständlich, da wir annehmen müssen, daß den Bakterien, wenn ihnen die Harnstoffspaltung gelingt, das entstehende

Ammoniak als einzige Stickstoffquelle zur Verfügung steht und es sich bei Vermehrung in diesen Harnstoff-Milchsäurenährboden also um eine Ammoniakassimilation handelt.

Wir sind zu aromatischen Verbindungen übergegangen. Daß es nicht allein die im Tryptophan vorhandene ringförmige Bindung ist, welche seine Brauchbarkeit für die ammoniaknichtassimilierenden Typhusbacillen ausmacht, wurde schon dadurch wahrscheinlich gemacht, daß es durch Tyrosin nicht ersetzbar ist, doch konnte dies, wie besprochen, auch daran liegen, daß von dieser schwer löslichen Verbindung zu wenig zur Verfügung stand. Benzoesäure selbst konnten wir zu diesen Versuchen nicht benützen, da Natrium benzocium, wie uns entsprechende Hemmungsversuche zeigten, bereits in der Verdünnung 1 : 1000 die Vermehrung von Paratyphus B-Bacillen im Milchsäure-Ammoniaknährboden hintanhält; diese Bakterien sind aber widerstandsfähiger als Typhusbacillen. Wir haben deshalb versucht, ob das Benzoylglykokoll, die **Hippursäure,** vielleicht den Typhusbacillen Wachstum gewähre. Auch das schlug fehl. In einem Nährboden, der 0,5% Kochsalz, 0,2% Phosphatgemisch, die üblichen Mengen Magnesiumsulfat, Calcium- und Eisensalz, 0,6% Hippursäure mit Natriumcarbonat auf die gewünschte Alkalescenz gebracht und außerdem 0,5% milchsaures Natrium als zweite Energiequelle enthielt, sind weder Paratyphus B-noch die beiden Typen von Typhusbacillen gewachsen. Daß der Nährboden an und für sich für Bakterienwachstum geeignet war, zeigte die Vermehrung eines Paracolistammes, der in Passagen fortzüchtbar war. Das gleiche Ergebnis hatten die Versuche mit **Harnsäure,** mit der wir als Ersatz des Indolkernes den Purinkern darbieten wollten. Ein Nährboden obiger Zusammensetzung mit 0,5% Harnsäure anstatt der Hippursäure (es bildete sich beim Erkalten ein geringer Niederschlag), gewährleistete weder den beiden Typen von Typhus- noch den Paratyphus B-Bakterien das Wachstum. Auch dieser Nährboden taugte an und für sich zur Vermehrung von Bakterien, wie ein gutes Gedeihen des Bacillus pyocyaneus bewies.

Und schließlich wurden noch einige Versuche mit komplizierteren Substanzen gemacht. Die übliche Anreicherung der Typhusbacillen in Rindergalle legte es nahe, das **taurocholsaure Natrium** als Nährstoff für Typhusbacillen zu versuchen. Der Nährboden enthielt außer den üblichen mineralischen Bestandteilen als einzige organische Verbindung 0,25% gallensaures Natrium, das uns von Herrn Geh.-Rat *Kossel* zur Verfügung gestellt wurde. Während der Paratyphus B-Stamm kräftig und in Passagen wuchs, haben sich die ammoniaknichtsassimilierenden Typhusbacillen nicht vermehrt. Und als wir schließlich zur **Hefenucleinsäure** übergingen, gelang es auch damit nicht, diese Typhusbacillen zum Wachstum zu bringen. Die Paratyphus B-

Bacillen aber wuchsen mit 0,25% Natrium nucleinicum gut, besser noch nach Zusatz von 0,5% Natriumlactat, doch konnten sich auch in diesem Nährboden die ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme nicht vermehren.

Diese willkürlich herausgegriffenen chemischen Körper möglichst verschiedener Konstitution haben also alle das Tryptophan als Stickstoffquelle für den anspruchsvolleren Typ der Typhusbacillen nicht zu ersetzen vermocht. Es geht daraus seine Bedeutung als Eiweißbaustein für den Stoffwechsel dieser Bakterien hervor. Daß aber das Tryptophan auch im Stoffwechsel anderer Bakterienarten eine wichtige Rolle spielt, geht aus den später zu besprechenden Versuchen über anaërobes Wachstum hervor.

Wenn wir nunmehr rückschauend die bis jetzt besprochenen Ernährungsversuche überblicken, so haben wir uns vor allem darüber Rechenschaft zu geben, inwieweit *innerhalb derselben Art die einzelnen Stämme differieren.* Betrachten wir die Paratyphus B-Bacillen, so findet man, daß sich in manchen Nährböden alle Stämme gleich verhalten, in anderen Nährböden aber Verschiedenheiten auftreten. In allen den Nährlösungen, die ein rasches und üppiges Wachstum gestatten, sind sämtliche geprüften Stämme gewachsen. Schwankungen haben wir nur dort beobachtet, wo auch die zur Vermehrung fähigen nur sehr langsam und spärlich wuchsen. Das war z. B. in Essigsäure- oder Oxalsäure-Ammoniaknährböden der Fall, oder wenn Glykokoll oder Leucin als alleinige Stickstoff- und -Kohlenstoffquelle vorhanden war. Dort also bereitete der Gewinn der zum Leben nötigen Energie Schwierigkeiten, und gerade *hierin sind einige Stämme anspruchsloser als andere, indem sie befähigt sind, mit geringerer Energiezufuhr auszukommen.* Und es sind, wenn auch nicht durchweg, die gleichen Stämme, die unter den verschiedenen Ernährungsbedingungen anspruchsloser als die übrigen sind.

Die Frage, ob die Gärtnerbacillen in ihren synthetischen Fähigkeiten von Paratyphus B-Bacillen verschieden sind, und ob sie sich in diesen einfachen Nährböden kulturell von diesen unterscheiden lassen, ist dahin zu beantworten, daß die beiden geprüften Gärtnerstämme sich so wie die etwas anspruchsvolleren unter den Paratyphus B-Stämmen verhalten, so z. B. im Oxalsäure-Ammoniaknährboden nicht wachsen. Doch sind sie in ihren Ernährungsbedürfnissen prinzipiell von den Paratyphus B-Stämmen *nicht* verschieden. Daß sie auch beim Aufbau aus diesen wenigen einfachen chemischen Körpern, wie z. B. im Milchsäure-Ammoniaknährboden, die gleichen serologischen Besonderheiten ihrer Rasse bilden wie in Bouillon, wurde früher bereits von uns[1]) mitgeteilt.

[1]) l. c.

Auch die beiden gaslosen Paratyphus B-Stämme verhalten sich in diesen künstlichen Nährböden wie die übrigen Paratyphus B-Bacillen.

Ähnlich wie beim Paratyphus B-Bacillus liegen die Verhältnisse bei den ammoniakassimilierenden Typhusstämmen; wir haben öfters betont, daß bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit und der in manchen dieser Nährböden bestehenden Schwierigkeit, die Bakterien zum Anwachsen zu bringen, sehr beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen bestehen, so daß im Laufe der Untersuchungen manche von ihnen durch besondere Anspruchslosigkeit, andere im Gegenteil durch größere Ansprüche individuelle Eigentümlichkeiten erkennen ließen. Die Frage, ob die ammoniakassimilierenden und nichtammoniakassimilierenden Typhusstämme verschieden befähigte Stämme der gleichen Art sind und also auch in dieser so bedeutsamen Eigenschaft Schwankungen vorkommen, kann erst später beantwortet werden.

Aber schon aus den eben besprochenen Verschiedenheiten der Stämme innerhalb derselben Art geht hervor, wie vorsichtig man sein muß, wenn man ernährungphysiologische Unterschiede als Artunterschiede wertet. Die gemachten Beobachtungen zeigen, daß sich dazu solche Nährböden, in denen das Wachstum der Keime infolge knapper Energievorräte nur dürftig ist, ganz besonders wenig eignen, weil die einzelnen Stämme der gleichen Art gerade in ihren *energetischen* Ansprüchen häufig verschieden sind. Wir haben aber bereits in den besprochenen Versuchen beobachtet, daß bei einzelnen Stämmen auch Eigenschaften fehlen können, welche die anderen Stämme der gleichen Art in besonders ausgeprägtem Maße besitzen. So war z. B. einer der ammoniakassimilierenden Typhusstämme im Milchsäure-Harnstoffnährboden trotz wiederholter Versuche nicht zur Vermehrung zu bringen, wohingegen die anderen geprüften Stämme und sogar ein zweiter aus demselben Patienten gewonnener Typhusstamm in Passagen kräftig wuchsen, wenn auch nicht jedesmal die Kultur anging.

Kehren wir nun zu der Frage nach der Typhus- oder Paratyphus B-Natur der ammoniakassimilierenden Typhusstämme zurück. In welchem Sinn spricht der Vergleich der Ernährungsbedürfnisse dieser drei Bakterien? Wir stellen fest, daß die Unfähigkeit der meisten Typhusstämme, das Ammoniak zu assimilieren, die wir eingangs dieser Veröffentlichung nur in Milchsäure-Ammoniaknährboden festgestellt haben, soweit es untersucht werden konnte, auch dann bestehen bleibt, wenn andersartige Kohlenstoffquellen und ausgiebigere Energiequellen zur Verfügung stehen als die Milchsäure. Es handelt sich also um eine sehr tief greifende Differenz in der Befähigung dieser beiden Typen von Stämmen. Andererseits bedingt die gemeinsame Fähigkeit der Ammoniakassimilation eine ziemlich weitgehende Ähnlichkeit der ammoniakassimilierenden Typhusstämme und der Paratyphus B-Bacillen.

Aber es haben sich zwischen diesen beiden Bakterien Verschiedenheiten ergeben. Die ammoniakassimilierenden Typhusstämme sind durchweg anspruchsvoller als die Paratyphus B-Bacillen; einmal wachsen sie überhaupt viel mühsamer und langsamer, und es findet in den einfachsten untersuchten Nährböden, dem Essigsäure- und Oxalsäure-Ammoniaknährboden, keine Vermehrung statt. Als prinzipiell dürfen wir aber diesen Unterschied nicht anerkennen, denn es gibt eben auch unter den Paratyphus B-Stämmen solche, die in diesen beiden Nährböden nicht wachsen. Dagegen finden wir im Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden einen für alle untersuchten Stämme geltenden Unterschied zwischen diesen beiden Bakterienarten. Paratyphus B-Bakterien wachsen in ihm, die ammoniakassimilierenden Typhusstämme dagegen *nicht*. Da wir wissen, daß dieser Typ von Typhusbacillen Ammoniak assimilieren kann und sie andererseits mit einfacheren Kohlenwasserstoffverbindungen als der Bernsteinsäure schon ihren Energiebedarf decken können, so müssen wir aus dem fehlenden Wachstum in diesem Nährboden darauf schließen, daß sie die Bernsteinsäure nicht angreifen können. Es sind also die verschiedenen Kohlenstoffverbindungen unter diesen einfachen Ernährungsverhältnissen nicht gleichmäßig verwertbar, sondern es sind bestimmte Bakterienarten außerstande, gerade diese oder jene Verbindung anzugreifen, wie wir das auch später noch bei Shiga-Kruse und Colibacillen werden beobachten können. Daß bei der Verwertung dieser Kohlenwasserstoffverbindungen als Kohlenstoff- und Energiequellen Oxydationen eine besondere Rolle spielen, liegt schon deshalb nahe, weil wir wissen, welche Rolle hier die erhöhte Sauerstoffzufuhr für die Vermehrung der Bakterien spielt. Doch sind dies auch bei ähnlich gebauten Verbindungen wie Milch-, Bernstein-, Äpfel-, Wein-, Citronensäure offenbar nicht gleichmäßige, einfache ernährungsphysiologische Leistungen der Bakterien, sondern es müssen komplizierte, bei bestimmten Bakterienarten auf bestimmte derartige Verbindungen eingestellte chemisch-physiologische Vorgänge sein. Außerordentlich schlecht wird auch die Oxybernsteinsäure von den ammoniakassimilierenden Typhusbacillen, sehr gut von den Paratyphus B-Bacillen zum Aufbau verwendet. In der Spaltung und Verwertung der Arabinose finden wir zwischen diesen eine weitere Verschiedenheit, die aber außerdem auf die Zugehörigkeit dieser ammoniakassimilierenden Typhusstämme zu den Typhusbacillen hinweist. Denn es ist nach *Wagners*[1]) Untersuchungen in bouillonhaltigen Nährböden Eigentümlichkeit der Typhusbacillen, daß sie die Arabinose nicht zu spalten vermögen.

Was nun die geprüften Aminosäuren mit Ausnahme des Tryptophans als Nährstoffe betrifft, so klafft auch da ein großer Unterschied zwischen den ammoniakassimilierenden und den ammoniaknichtassi-

[1]) l. c.

milierenden Typhusstämmen, während sich Paratyphus B-Bacillen und der anspruchslose Typ von Typhusbacillen sehr ähnlich sind. Wir haben also in bezug auf Stickstoffassimilation in zweierlei Hinsicht Differenzen zwischen den beiden Typen von Typhusstämmen gefunden, einmal in der Fähigkeit, Ammoniak zu assimilieren, ein anderes Mal in der Verwertung der einfachen Aminosäuren als Stickstoffquelle. Da liegt der Gedanke nahe, daß die Ursache beider Beobachtungen die gleiche, nämlich das Vermögen oder Unvermögen zur Ammoniakassimilation, ist. Denn in den Aminosäuren ist der Stickstoff als Ammoniak vorhanden; außerdem sehen wir, daß z. B. von Paratyphus B-Bacillen nur einzelne Stämme von Essigsäure und Ammoniak und ebenfalls nur vereinzelte mit Aminoessigsäure, daß sie besonders gut mit Oxypropionsäure und Ammoniak und ebenso vortrefflich mit Aminopropionsäure sich ernähren, daß die ammoniakassimilierenden Typhusstämme nicht mit Essigsäure und Ammoniak und ebensowenig mit Aminoessigsäure zu gedeihen imstande sind, und daß die Unfähigkeit, Bernsteinsäure bei Gegenwart von Ammoniak anzugreifen dem fehlenden oder kümmerlichen Wachstum mit Aminobernsteinsäure entspricht. Dies ist wohl dahin zu deuten, daß die Verwertung dieser Aminosäuren als Stickstoffquellen ebenfalls eine Ammoniakassimilation ist. Im gleichen Sinne spricht die Tatsache, daß die zur Ammoniakverwertung nicht befähigten Stämme diese Aminosäuren nicht als Stickstoffquellen benützen können. Auch die Unfähigkeit der ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme, im Harnstoff-Milchsäurenährboden zu wachsen, muß nicht nur auf einem Unvermögen zur Harnstoffspaltung beruhen, sondern kann sich auch durch die Unfähigkeit erklären, das durch diese Spaltung gewonnene Ammoniak zu assimilieren.

Wir finden also, daß die beiden Typen von Typhusstämmen nur durch Vermögen und Unvermögen, das Ammoniak zu assimilieren, verschieden sind, daß ihnen hingegen, wie z. B. das Verhalten gegenüber Arabinose zeigt, gewisse Eigenschaften gemeinsam sind, die allen ihren Stämmen zukommen und die sie von Paratyphus B-Bacillen trennen. Die weiteren Untersuchungen müssen nun noch den Beweis dafür erbringen, daß tatsächlich unter den Typhusbacillen, d. h. innerhalb derselben Art, eine so bedeutsame Fähigkeit, wie die Ammoniakassimilation, bei einem Stamm vorhanden sein, beim andern fehlen kann.

d) Weitere vergleichende Untersuchungen zwischen Paratyphus B-Bacillen, ammoniakassimilierenden u. ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämmen.

Die *Virulenz.*

Zunächst war die Virulenz zu prüfen. Es ist bekannt, daß Paratyphus B- und die Gärtnerbacillen für weiße Mäuse pathogen sind, daß aber diese Tiere für Typhusbacillen wenig oder gar nicht empfindlich sind. Es

konnte uns also die vergleichende Virulenzprüfung weitere Anhaltspunkte für die Stellung der ammoniakassimilierenden Typhusstämme zu den Paratyphus B-Bacillen geben. Es wurden drei Paratyphus B-Stämme, darunter ein gasloser, zwei Gärtnerstämme, drei ammoniaknichtassimilierende und fünf ammoniakassimilierende Typhusstämme untersucht. Die Mäuse bekamen 0,1 ccm einer 24stündigen Bouillonkultur subcutan injiciert. Das Resultat war: zwei Paratyphus B-Stämme töteten nach 1 resp. 2 Tagen, der gaslose Stamm am 6. Tage, die beiden Gärtnerstämme am 4. Tag nach der Injektion; aus jeder gestorbenen Maus wurden die injizierten Bakterien aus dem Herzblut wieder gezüchtet. Die drei nichtammoniakassimilierenden und die fünf ammoniakassimilierenden Typhusstämme vermochten die Mäuse in der angewandten Menge nicht zu töten, sämtliche Tiere waren nach 14 Tagen noch am Leben. Es fehlte diesen Stämmen also die Virulenz für weiße Mäuse, und sie waren demnach auch in dieser Beziehung untereinander gleich und von Paratyphus B- und Gärtner-Bacillen verschieden.

Die Empfindlichkeit gegenüber Desinfektionsmitteln.

Auch in der Empfindlichkeit gegenüber Desinfektionsmitteln zeigten diese drei Bakterien untereinander Verschiedenheiten. Während die Carbolsäure in ihrer entwicklungshemmenden Wirkung diesen Unterschied nicht hervortreten ließ, kam er mit Trypaflavin deutlich zum Ausdruck. Es wurden vier ammoniaknichtassimilierende und fünf ammoniakassimilierende Typhusstämme, vier Paratyphus B-, darunter ein gasloser, und ein Gärtnerstamm geprüft. Auch hier zeigten sich Schwankungen unter den Stämmen der gleichen Art. Die entwicklungshemmende Verdünnung des Trypaflavins in Nährbouillon lag: bei Gärtnerbacillen unter 1 : 5000, bei Paratyphus B-Stämmen zwischen 1 : 5000 und 1 : 7500, bei den ammoniakassimilierenden und nichtammoniakassimilierenden Typhusstämmen zwischen 1 : 20 000 und 1 : 37500. Auch in dieser Eigenschaft gleichen sich also die beiden Typen von Typhusstämmen und unterscheiden sich von den Paratyphus B-Bacillen.

Agglutination.

Schließlich wurde das agglutinatorische Verhalten dieser beiden Typen von Typhusstämmen verglichen und die Verschiedenheiten gegenüber den in serologischer Hinsicht so nahestehenden Gärtnerbacillen untersucht. *Van Loghem*[1]) hat zwei auf besondere Weise gewonnene, ammoniakassimilierende Typhusstämme und eine ammoniaknichtassimilierende Kultur mit Krankenserum agglutiniert und dabei keine Unterschiede gefunden. Die Untersuchung des antigenen Apparates dieser

[1]) l. c.

Tabelle III.

Vergleichende Agglutination ammoniakassimilierender und -nichtassi-
ammoniakassimilierenden und -nicht-

Kaninchen-Immun-Serum (80), gewonnen mit einem ***ammoniaknichtassimilierenden*** Typhusstamm (*T*)

	Stämme	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	C
Ammoniak-*nicht*assimilierende Typhusstämme	*T*	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	(+)	(+)	(+)	?	0	0	0
	K_{11}	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	+	(+)	(+)	0	0	0
	901 (Weil)	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	(±)	0	0	0
	W_2 (Weil)	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	$+^{s}$	(+ +)	(±)	?	0	0
	5139	+ +	+ +	+ +	+ +	$+^{s}$	(+ +)	(+ +)	0	0	0	0	0
Ammoniak-assimilierende Typhusstäm.	4602	+	+	+	+	$+^{s}$	$+^{s}$	(+)	0	0	0	0	0
	4867	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	$+^{s}$	(+)	0	0	0	0
	7559	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	+	$+^{s}$	(+)	(±)	0	0	0
Gärtnerstamm	*G*	+	+	$+^{s}$	(+)	$(+^{s})$	$(+^{s})$	0	0	0	0	0	0

Zeichenerklärung: + + + bedeutet große, grobe Flocken, Klärung der Flüssigkeit. + + be- bloßem Auge gut sichtbare, feine Flocken. Keine Klärung der Flüssigkeit. $+^{s}$ bedeutet mit bei Lupenvergrößerung große Flocken, getrübte Flüssigkeit. (+) bedeutet bei Lupenvergrößerung getrübte

beiden Typen von Typhusbacillen erfordert aber eine eingehendere Bearbeitung. Wir stellten uns mit einem ammoniakassimilierenden und einem nichtammoniakassimilierenden Typhusstamm je zwei Kaninchenimmunsera her, indem wir die Tiere mit steigenden Dosen durch Äther abgetöteter, später mit lebenden Kulturen behandelten. Wir erhielten so vier Sera, deren Titer zwischen 1 : 6400 und 1 : 409 600 lag. Mit diesen Sera wurden sieben ammoniaknichtassimilierende und fünf ammoniakassimilierende Typhusstämme und ein Gärtnerstamm geprüft. Tabelle III gibt einen Teil dieser Versuche wieder. Es zeigte sich, daß die mit dem ammoniaknichtassimilierenden Typhusstamm gewonnenen Immunsera die Repräsentanten beider Typen von Typhusbacillen bis zur Titergrenze agglutinierten und daß durch die mit dem ammoniakassimilierenden Typhusstamm hergestellten Sera ebenfalls beide Typen bis zur gleichen Titerhöhe zur Ausflockung kamen. Der Gärtnerstamm wurde von allen vier Sera weniger hoch, bisweilen aber, wie das angegebene Versuchsbeispiel zeigt, beträchtlich agglutiniert. Diese Versuche zeigen also, daß die ammoniakassimilierenden und nichtammoniakassimilierenden Typhusstämme agglutinatorisch identisch sind. Wir haben der Vollständigkeit halber einen *Castellani*schen Versuch gemacht. Es wurde ein Typhusimmunserum, das mit dem ammoniaknichtassimilierenden Stamm gewonnen war, mit Gärtnerbacillen erschöpft, so daß keine Agglutination dieser Bakterien mehr auftrat. Dieses erschöpfte Serum agglutinierte aber sowohl den eigenen Stamm, als zwei ammoniakassimilierende Typhusstämme fast bis zur Titergrenze. Es können also die ammoniakassimilierenden Typhusstämme keine gaslosen Gärtnerbacillen sein.

Tabelle III

milierender Typhusstämme durch Typhus-Immun-Sera, welche mit assimilierenden Stämmen gewonnen sind.

Kaninchen-Immun-Serum (33), gewonnen mit einem *ammoniakassimilierenden* Typhusstamm (4602)											
1/100	1/200	1/400	1/800	1/1000	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	C	
− + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+	(+ +)	(+)	0	0	0	Ammoniak-*nicht*assimilierende Typhusstämme
+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	+[s]	(+ +)	(+)	0	0	0	
+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+	(+)	(±)	0	0	0	
+ +	+ +	+ +	+ +	+	+	+[s]	(±)	0	0	0	
+ +	+ +	+ +	+	+	+[s]	(+ +)	0	0	0	0	
+	+	+	+	+	(+)	(+)	0	0	0	0	Ammoniakassimilierende Typhusstäm.
+ +	+ +	+ +	+	+	+	(+ +)	(+)	0	0	0	
+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	+[s]	(+ +)	(+)	0	0	0	
(+ +)	(+ +)	(+)	(+)	0	0	0	0	0	0	0	Gärtnerstamm

deutet kleinere, feine Flocken. Keine vollständige Klärung der Flüssigkeit. + bedeutet mit bloßem Auge noch eben sichtbare, feine Flocken. Keine Klärung der Flüssigkeit. (+ +) bedeutet kleine Flocken, getrübte Flüssigkeit. (±) bedeutet bei Lupenvergrößerung angedeutete Flockung. Flüssigkeit.

Bei unseren ersten Agglutinationsversuchen schien es so, als ob unsere beiden *ernährungsphysiologischen Typen* von Typhusbacillen sich mit den von *Weil* und *Felix*[1]) beschriebenen *serologischen Typen,* den grob- und den feinflockenden Typhusstämmen decken. Das war aber, wie die nähere Untersuchung zeigte, nicht der Fall. Wie auch die in die Tabelle aufgenommenen Beispiele zeigen, befinden sich sowohl unter den ammoniakassimilierenden, wie unter den ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämmen grob- und feinflockende Typen. Und die beiden von *Weil* und *Felix* beschriebenen Stämme (901 und W_2 der Tabelle) vermögen beide das Ammoniak nicht zu verwerten.

Die angestellten Versuche haben also ergeben, daß die ammoniakassimilierenden Typhusstämme, welche zwar durch die Fähigkeit, in ammoniakhaltigen Nährböden zu wachsen, den Paratyphus B-Bacillen in ihren synthetischen Fähigkeiten ähneln und sich auch in Lackmusmolke wie die Paratyphus B-Bacillen verhalten, doch in Anbetracht bestimmter ernährungsphysiologischer Merkmale und ihres sonstigen biologischen, besonders agglutinatorischen Verhaltens als Typhusbacillen angesprochen werden müssen. Somit stehen wir vor der Tatsache, daß wir innerhalb derselben Art zwei ernährungsphysiologisch ganz verschiedene Typen anerkennen müssen. Nach den obigen Feststellungen fanden sich diese beiden getrennt, jeder für sich in Typhuskranken vor. Welche Beziehung besteht nun zwischen ihnen ? Stammen sie voneinander ab und welches ist der ursprüngliche ? *Van Loghem* gibt an, daß ihm

[1]) *Weil* und *Felix,* Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. 29. 1920.

ein ammoniakassimilierender Typhusstamm bei Weiterzüchtung nicht mehr in dem ammoniakhaltigen Nährboden wuchs; auch das Umgekehrte hat sich ihm ereignet.

Es ist uns nun gelungen, experimentell aus ammoniaknichtassimilierenden Stämmen ammoniakassimilierende zu gewinnen und so die Abstammung des einen Typs aus dem anderen zu erweisen.

e) Die Gewinnung ammoniakassimilierender Typhusstämme aus ammoniaknichtassimilierenden.

Wir erinnern uns der im Citronensäure-Ammoniaknährboden gemachten Beobachtung: Auf stark beimpften agarhaltigen derartigen Nährböden wuchsen nur einzelne Keime zu Kolonien aus, und es konnte so die im flüssigen Nährboden beobachtete lange Dauer bis zum Auftreten sichtbaren Wachstums dadurch erklärt werden, daß nur wenige Keime dieser Stämme die Fähigkeiten hatten, Citronensäure und Ammoniak zu verwerten. Schon dieser Versuch hatte also die Existenz von Keimen verschiedener Eigenschaften innerhalb einer Kultur nahegelegt. Die besondere Fähigkeit dieser dort beobachteten Keime bezieht sich nur auf die Verwertung der Citronensäure, nicht auf die Ammoniakassimilation, denn impft man einen solchen Typhusstamm auf agarhaltigen milchsäurehaltigen Ammoniaknährboden, so entstehen keine vereinzelten isolierten Kolonien, sondern es wächst ein zusammenhängender Rasen heran, zum Zeichen, daß alle oder mindestens die große Mehrzahl der Keime zur Verwertung von Milchsäure und Ammoniak befähigt sind. Sollte es nun so sein, daß es doch unter den einzelnen Keimen *desselben* Stammes Unterschiede in der Fähigkeit, das Ammoniak zu assimilieren, gibt, und die besonders befähigten Keime bei den ammoniakassimilierenden Stämmen sehr häufig, bei den ammoniak-nichtassimilierenden so selten sind, daß sie nicht zur Beobachtung kommen?

Von dieser Vorstellung ausgehend haben wir versucht, derartige zur Ammoniakassimilation befähigte Keime aus nichtammoniakassimilierenden Stämmen anzureichern. Aus Stämmen, die bei oftmals wiederholter Prüfung im Milchsäure-Ammoniaknährboden nicht zum Wachstum zu bringen waren, haben wir diesen Nährboden nicht wie üblich, mit kleiner Einsaat beimpft, sondern es wurde der ganze Rasen eines gut gewachsenen Schrägnähragarröhrchens mit der Öse abgenommen und in 5 ccm dieses am Boden eines kleinen Kölbchens ausgebreiteten Milchsäure-Ammoniaknährbodens eingerieben, so daß eine dichte weiße Bakterienemulsion entstand. Dieser „massig beimpfte“ Nährboden wurde nun bebrütet, um den darin vielleicht enthaltenen wenigen Keimen, welchen die Fähigkeit der Ammoniakassimilation innewohnt, Zeit zur Vermehrung zu geben. Nach 3, 7 und 12 Tagen wurden Passagen im Milchsäure-Ammoniaknährboden durch Übertragung von drei

bis fünf Ösen angelegt und nun zeigte sich tatsächlich, daß diese Überimpfung zwar noch nicht am 3. Tage, wohl aber am 7. oder 12. Tage von Erfolg begleitet war, und sich ein aus der „massigen" Kultur neu beimpfter Milchsäure-Ammoniaknährboden nach einiger Zeit trübte, und eine Reinkultur von Typhusbacillen heranwuchs, welche sich in beliebig zahlreichen Passagen im Milchsäure-Ammoniaknährboden weiter fortzüchten ließ. *Es war also aus dem nichtammoniakassimilierenden Typhusstamm ein ammoniakassimilierender gewonnen.* Diese einmal im Milchsäure-Ammoniaknährboden angereicherten Keime behielten ihre Fähigkeit, das Ammoniak zu verwerten, auch wenn sie auf anderen Nährböden lebten, bei. Wenn man z. B. aus der 4. Passage im einfachen künstlichen Nährboden ein Nähragarröhrchen beimpfte, diese Kultur in mehreren Passagen einige Wochen lang auf Nähragar hielt, und dann den ammoniaknichtassimilierenden Mutterstamm und den aus ihm gewonnenen ammoniakassimilierenden vom Nähragar in einen Milchsäure-Ammoniaknährboden einimpfte, so blieb bei dem Mutterstamm jede Vermehrung aus; bei dem daraus gewonnenen, einmal im Milchsäure-Ammoniaknährboden gewachsenen Stamm trat auch jetzt wieder Wachstum auf.

Diese Abspaltung besonders befähigter Keime ist nicht mit allen ammoniaknichtassimilierenden Stämmen, mit denen es versucht wurde, gelungen; bei dreien glückte es in der beschriebenen Weise, bei acht anderen nicht. Die so gewonnenen ammoniakassimilierenden Kulturen wuchsen nun nicht allein im Milchsäureammoniaknährboden, also unter den Ernährungsverhältnissen, in denen ihre Anreicherung gelungen war, sondern diese Auslese bezog sich offensichtlich auf die Ammoniakassimilation überhaupt, denn diese Kulturen konnten auch in Nährböden mit anderen Kohlenstoffquellen wachsen und *verhielten sich wie die von vornherein ammoniakassimilierenden Typhusstämme.* So wuchsen sie z. B. auch im Citronensäure-Ammoniaknährboden, doch taugten auch die durch Auslese gewonnenen ammoniakassimilierenden Keime nicht alle zur Citronensäureverwertung, sondern auch in diesem Nährboden fand nun erst wieder durch allmähliches Heranwachsen der dazu passenden Keime eine abermalige Auswahl statt.

Wir haben also innerhalb einer Population von Typhusbakterien das Vorkommen von Keimen verschiedener Befähigung beobachtet. In dem eben besprochenen Versuche waren es 1. Keime, die Ammoniak nicht assimilieren, 2. solche, die Ammoniak zum Aufbau benützen können; unter den letzteren a) solche, die Citronensäure nicht und b) Keime, die Citronensäure wohl verwerten können.

Eine Anreicherung ammoniakassimilierender Keime ist nicht nur in ammoniakhaltigen Nährböden möglich, sondern sie kann auch unter komplizierteren Ernährungsbedingungen stattfinden, wenn dabei ge-

rade die ammoniakassimilierenden Bakterien besonders gute, die ammoniaknichtassimilierenden aber nur schlechte Wachstumsmöglichkeit finden. Ein solcher Nährboden ist z. B. die natürliche *Petruschky*sche Lackmusmolke. Wir haben eingangs dieser Untersuchungen von einem im Milchsäure-Ammoniaknährboden nichtwachsenden Typhusstamm gesprochen, der zwar meistens die Lackmusmolke nur rötete, gelegentlich aber nach 14tägiger Bebrütung einen Umschlag nach Blau hervorrief. Beimpfte man nun aus einer solchen gebläuten Lackmusmolke den Milchsäure-Ammoniaknährboden, so stellte sich heraus, daß die alkalibildenden Typhusbacillen darin in Passagen fortzüchtbar waren. Es kann also auch in dieser Lackmusmolke gelegentlich eine Anreicherung ammoniakassimilierender Keime stattfinden.

Das Umgekehrte nun, in ammoniakassimilierenden Stämmen ammoniaknichtassimilierende Keime zu finden, gelang nur einmal durch Zufall. Bei der Reinzüchtung eines durch Luftkeime verunreinigten, seit längerer Zeit als ammoniakassimilierend bekannten Typhusstammes wurde von der Agarplatte eine Kolonie abgestochen, aus welcher eine Typhuskultur heranwuchs, die im Milchsäure-Ammoniaknährboden nicht zum Wachstum zu bringen war. Spätere Versuche, diesen einmal zufällig erhobenen Befund experimentell zu reproduzieren, glückten aber nicht. Wir haben von Nähragarplatten, die mit ammoniakassimilierenden Stämmen beimpft waren, je 10 isolierte Kolonien auf Ammoniakassimilation untersucht. Stach man die Kolonien direkt in den Milchsäure-Ammoniaknährboden ab, so wuchs die Mehrzahl dieser Kulturen und nur einzelne nicht; doch lag das Ausbleiben des Wachtums an der zu kleinen Einsaat; denn sobald man außer dem Milchsäure-Ammoniaknährboden von jeder dieser 10 Kolonien nebenbei noch ein Schrägagarröhrchen beimpfte, und dann dort, wo die Milchsäure-Ammoniakkultur nicht anging, aus der von der gleichen Kolonie stammenden Nähragarkultur diesen einfachen künstlichen Nährboden beimpfte, so trat jedesmal Wachstum auf. Wir müssen also annehmen, daß in den ammoniakassimilierenden Typhusstämmen Keime mit dem Unvermögen, das Ammoniak zu verwerten, nicht vorhanden oder jedenfalls sehr selten sind.

Aus allen den eben besprochenen Versuchen läßt sich verstehen, wie es vorkommen kann, daß ein aus vielen Versuchen als nichtammoniakassimilierend bekannter Typhusstamm sich später, nachdem er inzwischen mehrmals reingezüchtet worden ist, als ammoniakassimilierend erweist. Auch mit der umgekehrten Möglichkeit müssen wir rechnen. So kann es geschehen, daß mit dem gleichen Stamm ausgeführte Untersuchungen mit weiter zurückliegenden Versuchen nicht mehr übereinstimmen und der Stamm bestimmte ernährungsphysiologische Eigenschaften dadurch geändert hat, daß die in ihm früher nur spärlich enthaltenen, in einer besonderen Richtung befähigten Keime jetzt allein vorhanden sind.

Die Versuche mit „massiger" Beimpfung sind ein experimenteller Beweis dafür, daß die Fähigkeit der einzelnen Keime innerhalb der Kultur verschieden und daß die einzelnen Stämme hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus den verschieden befähigten Keimen unterschiedlich konstituiert sein können. Daraus erklärt sich leicht der verschiedene Charakter der einzelnen Typhusstämme: Die ammoniakassimilierenden Typhusstämme enthalten überwiegend Keime, welchen die Fähigkeit der Ammoniakverwertung zukommt. Dann gibt es Stämme, in denen diese ammoniakassimilierenden Keime selten sind, so daß sich diese Stämme bei kleiner Einsaat in den Milchsäure-Ammoniaknährboden nicht vermehren; das sind die Stämme, bei denen erst durch massige Beimpfung eine Anreicherung dieser Keime und so die Gewinnung ammoniakassimilierender Kulturen gelingt. Und schließlich finden sich Stämme, bei denen die ammoniakverwertenden Individuen fehlen oder so selten sind, daß ihre Anreicherung nicht gelingt. Das ist die Mehrzahl der ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämme. Die mittlere Kategorie stellt also eine Brücke zwischen zwei Extremen dar.

Die Typhusstämme, bei denen der Nachweis verschieden befähigter Keime gelingt, die also selbst im Milchsäure-Ammoniaknährboden nicht wachsen, aus denen aber ammoniakassimilierende Kulturen gewonnen werden können, sind ihrerseits durch mehrmalige Reinzüchtung aus einer Kolonie resp. einem Keim hervorgegangen. Wir müssen also schließen, daß diese Keime verschiedener Befähigung voneinander abstammen, und wir dürfen wohl annehmen, daß die mit größeren synthetischen Fähigkeiten ausgestatteten Individuen, welche einfacheren äußeren Verhältnissen angepaßt sind, den ursprünglicheren Typ darstellen. Unter welchen Umständen die ammoniakassimilierenden Keime zu ammoniaknichtassimilierenden werden, wissen wir nicht.

In der folgenden Mitteilung werden wir zeigen, daß derartige tiefgreifende Unterschiede in der Stickstoffassimilation zwischen Stämmen der gleichen Art und sogar zwischen Keimen desselben Stammes nicht nur bei Typhusbacillen, sondern auch bei anderen Bakterienarten vorkommen.

Der Verwendungsstoffwechsel pathogener Bakterien.

II. Mitteilung.

Von

H. Braun und C. E. Cahn-Bronner.

(Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung des Hygienischen Universitäts-Institutes in Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 18. April 1922.)

II. Teil.

Die Ernährungsbedürfnisse und synthetischen Fähigkeiten der Paratyphus-A-Bacillen.

a) Die ammoniak-nicht-assimilierenden Paratyphus-A-Stämme.

In einer unserer früheren Mitteilungen[1]) wurden bereits einige Versuche über die synthetischen Fähigkeiten von Paratyphus A-Bacillen besprochen. Diese Untersuchungen sind inzwischen fortgesetzt worden, wobei wir uns die mit Typhusbacillen gemachten Erfahrungen zunutze gemacht haben. Die damaligen Versuche zeigten, daß die untersuchten Stämme Ammoniak nicht zu assimilieren vermochten. Auch *Kisch*[2]), der die für den Paratyphus A-Bacillus ausnützbaren Stickstoffquellen untersuchte, legt besonderen Wert darauf, daß alle seine Stämme das Ammoniak nicht verwerten konnten, und gibt diese Unfähigkeit als differentialdiagnostisches Hilfsmittel gegenüber Paratyphus B-Bacillen an. Es standen uns vier Paratyphus A-Stämme zur Verfügung, davon waren zwei ältere Sammlungsstämme und zwei in den Jahren 1919 und 1921 aus einem Paratyphus A-Kranken und einem Bacillenträger gezüchtet. Die letzteren zwei sind in allen hier zur Besprechung kommenden Nährböden geprüft, die anderen beiden zur Ergänzung herangezogen worden. Alle vier waren unfähig, aus Ammoniak als einziger Stickstoffquelle ihre Leibessubstanz aufzubauen, einerlei welche Kohlenstoffverbindung man ihnen bot. So sind sie im Gegensatz zu Paratyphus B-Bacillen mit Milchsäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, Citronensäure, Glycerin nicht zur Vermehrung gebracht worden, trotz dreiwochenlanger Bebrütung in flacher Flüssigkeitsschicht. Die Nährböden hatten die oben[3]) bei der Be-

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. 86, H. 3. 1921.

[2]) Zentralbl. f. Bakteriol, usw. 82. 1919.

[3]) Siehe die vorhergehende I. Mitteilung in dieser Zeitschrift.

sprechung der Typhusbacillen angegebene Zusammensetzung und enthielten alle die üblichen Mengen von Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Eisensulfat. Auch das Nitrat konnten diese Stämme, wenn es die einzige Stickstoffquelle war, nicht verwerten, einerlei ob Milchsäure, Traubenzucker, Glycerin oder Citronensäure gleichzeitig vorhanden war. Von den Aminosäuren konnten Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure und Leucin als einzige organische Nährsubstanzen keine Vermehrung herbeiführen. Wurde Milchsäure als zweite Energiequelle hinzugefügt, so blieb trotzdem mit Glykokoll und Alanin jedes Wachstum aus; mit Asparaginsäure zeigte ein Stamm in mehrmaligen Versuchen nur einmal eine ganz geringe Vermehrung; mit Leucin und Milchsäure waren zwei Stämme, nachdem lange Zeit der Nährboden klar geblieben war, der eine erst nach zwei Wochen langer Bebrütung, in Passagen züchtbar; doch gelang es auch in diesem Nährboden nicht regelmäßig, diese Stämme zum Wachstum zu bringen, eine Beobachtung, die sich durch die gleich zu besprechenden Versuche erklärt. Das uns von Herrn Prof. *Neuberg* zur Verfügung gestellte Tryptophan erlaubte hingegen eine üppige Vermehrung der Paratyphus A-Bacillen auch ohne Milchsäure. Im Harnstoff-Milchsäurenährboden vermochten sie nicht zu wachsen.

Diese Paratyphus A-Stämme zeigen also eine weitgehende Übereinstimmung mit den ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämmen. Abweichend war nur ihr gelegentliches Wachstum in Asparaginsäure- oder Leucin-Milchsäurenährboden, im übrigen aber war bei beiden Arten eine Vermehrung solange ausgeschlossen, als Ammoniak oder Nitrat die einzige verfügbare Stickstoffverbindung war.

b) Die Gewinnung ammoniak-assimilierender Paratyphus-A-Stämme.

Wir haben also unter den uns zur Verfügung stehenden Paratyphus-A-Stämmen keine ammoniakassimilierenden gefunden. Nach den an Typhusbacillen gemachten Erfahrungen trat nun die Frage nahe, ob es vielleicht auch hier durch „massige“ Einsaat in den Milchsäure-Ammoniak-Nährboden gelingt, ammoniakassimilierende Kulturen zu gewinnen. Es wurde also von drei Stämmen der ganze Rasen eines Schrägagarröhrchen in eine flache Flüssigkeitsschicht des Milchsäure-Ammoniaknährbodens eingetragen und bebrütet. Und tatsächlich gelang bei zwei Stämmen schon 3 Tage später die Übertragung und Weiterführung der Kultur in demselben Nährboden. Bei einem dritten Stamm bedurfte es einer 6tägigen Bebrütung dieses massig beimpften einfachen Nährbodens, bis auch hier Passagen im Milchsäure-Ammoniaknährboden gelangen. Es war also bei unseren Paratyphus A-Stämmen leichter als bei Typhusbacillen und es glückte prozentual häufiger, aus nichtammoniakassimilierenden Kulturen ammoniakassimilierende zu gewinnen. Brachte man diese auf Nähragar zurück, züchtete sie dort ebenso wie den ammoniaknichtassi-

milierenden Mutterstamm fort und impfte dann nach 4 Wochen die beiden Stämme wiederum in den Milchsäure-Ammoniaknährboden ein, so vermehrte sich der Mutterstamm nicht, dagegen zeigte die daraus gewonnene Kultur auch jetzt darin wieder ein in Passagen fortführbares, ziemlich kräftiges Wachstum. Legte man von diesem ammoniakassimilierenden Stamm eine Agarplatte an und prüfte zehn isolierte Kolonien auf ihr Vermögen, Ammoniak zu assimilieren, so erfuhr man, daß alle zehn so gewonnenen Kulturen ammoniakassimilierende Keime enthielten. Die Verhältnisse lagen hier gerade wie bei den ammoniakassimilierenden Typhusstämmen: Stach man die Kolonien direkt in den flüssigen Milchsäure-Ammoniaknährboden ab, so dauerte es 4—10 Tage, bis sichtbares Wachstum auftrat, bisweilen blieb es aber bei einigen ganz aus. Dies lag offensichtlich an einer zu geringen Einsaat, denn sobald man den Milchsäure-Ammoniaknährboden aus einer von der gleichen Kolonie stammenden Nähragarkultur beimpfte, so trat in 2 Tagen deutliches Wachstum auf. — Wir haben also aus drei ammoniaknichtassimilierenden Paratyphus A-Stämmen drei Kulturen gewonnen, die ausschließlich oder überwiegend aus ammoniakassimilierenden Keimen zusammengesetzt waren.

Als wir diese so gewonnenen Kulturen in *Petruschky*scher Lackmusmolke untersuchten, schlug eine davon nach wenigen Tagen um. Sie glich also darin völlig dem Paratyphus B-Bacillus. In der *Seitz*schen „Lackmusmolke" von bekannter und konstanter, oben angegebener Zusammensetzung, die als flache Flüssigkeitsschicht am Boden kleiner Erlenmeyerkölbchen ausgebreitet war, haben wir nun die drei ammoniakassimilierenden Stämme mit den zugehörigen ammoniaknichtassimilierenden Mutterstämmen verglichen. Diese letzteren röteten die künstliche Lackmusmolke nach 48 Stunden, ohne sie zu trüben. Auch im Verlauf von 14 Tagen trat weder stärkere Vermehrung noch Farbumschlag ein. Die drei ammoniakassimilierenden Stämme aber trübten und röteten den Nährboden schon nach 24 Stunden, zwei davon bewirkten nach etwa 8 Tagen unter rasch zunehmender Trübung eine starke Alkalibildung, bei einem kam es nicht zum Farbumschlag. Die Verhältnisse liegen hier also geradeso, wie wir sie bei den Typhusbacillen beobachten konnten. Wir erinnern uns, daß die Untersuchungen mit diesen Bakterien in künstlicher Lackmusmolke einen Zusammenhang zwischen der Verwertung der Citronensäure und des Ammoniaks einerseits und dem Farbumschlag andererseits ergeben haben. Sind diese aus Paratyphus A-Stämmen gewonnenen, die Lackmusmolke bläuenden Kulturen auch als Paratyphus A-Stämme anzusprechen, oder haben wir Paratyphus B-Bakterien vor uns? Bei der serologischen Prüfung wurden die ursprünglich nichtammoniakassimilierenden Paratyphus A-Stämme und die daraus gewonnenen ammoniakassimilierenden Kulturen in gleicher

Höhe und Intensität durch Paratyphus A-Immunserum agglutiniert. Bei der Agglutination durch Paratyphus B-Immunserum erfolgte bei beiden Stämmen nur eine ganz geringe Mitagglutination. Nach den an Typhusbacillen erhobenen, ganz entsprechenden Befunden haben wir also keinen Grund daran zu zweifeln, daß wir hier zur Ammoniakassimilation befähigte Paratyphus A-Bacillen vor uns haben, die aus nicht-ammoniakassimilierenden Stämmen, durch Anreicherung der in ihnen enthaltenen ammoniakassimilierenden Keime, gewonnen worden sind.

c) Die Ernährungsbedürfnisse der ammoniak-assimilierenden Paratyphus A-Bacillen.

Wir haben nun die Ernährungsbedürfnisse und die synthetischen Fähigkeiten dieser ammoniakassimilierenden Paratyphus A-Bakterien untersucht. Erst ihre Auffindung gab ja die Möglichkeit, exakt zu prüfen, aus welchen Kohlenstoff- und Energiequellen die Paratyphus A-Bacillen ihr Körpereiweiß aufzubauen vermögen. Denn in unseren üblichen komplizierten Laboratoriumsnährböden, z. B. in einer Nährbouillon, ist dies höchstens auf analytisch-chemischem Wege möglich, wenn nicht die Spaltungen dieser Verbindungen an leicht erkennbaren Stoffwechselprodukten (z. B. Säure oder Gas) konstatierbar sind. Aber ganz abgesehen von diesen Schwierigkeiten können solche Untersuchungen an ammoniaknichtassimilierenden Stämmen weder in Pepton noch in tryptophanhaltigen Nährböden ähnlich exakte Resultate geben, denn wir haben ja nie nur *eine* einzige Kohlenstoffquelle in diesen Nährböden, sondern, außer der auf Nährtüchtigkeit zu prüfenden, zum mindesten in der organischen Stickstoffverbindung eine weitere Kohlenstoff- und Energiequelle. — Außerdem sind wir jetzt in der Lage, die ammoniakassimilierenden Paratyphus A-Bacillen mit den ammoniakassimilierenden Typhus- und Paratyphus B-Bakterien zu vergleichen und ihre Stellung zueinander zu untersuchen. Alle Versuche sind mit den drei gewonnenen ammoniakassimilierenden Paratyphus A-Stämmen durchgeführt worden.

Wir verfolgen wieder eine Reihe von einfachen zu komplizierteren Kohlenwasserstoffverbindungen. Die Nährböden hatten die gleiche Zusammensetzung wie die in der vorstehenden Mitteilung für Typhusbacillen angegebenen. In Essigsäure- und Oxalsäure-Ammoniaknährböden sind die ammoniakassimilierenden Paratyphus A-Stämme gerade wie die Typhusstämme und im Gegensatz zu einem Teil der Paratyphus B-Stämme nicht gewachsen. Im Milchsäure-Ammoniaknährboden, also unter den Ernährungsbedingungen, unter denen die Anreicherung der ammoniakassimilierenden Keime vorgenommen worden war, wuchsen diese nach der Beimpfung von Nähragar in 2—5 Tagen bis zu ziemlich dichter Trübung des Nährbodens heran, die Schnelligkeit und

Sicherheit des Anwachsens nach der erstmaligen Beimpfung war zwar größer als bei den ammoniakassimilierenden Typhusstämmen, erreichte aber nicht das rasche und üppige Wachstum der Paratyphus B-Bacillen. Es riß zwar gelegentlich die fortlaufende Kette der Passagen ab, war aber durch nochmalige Beimpfung eines neuen Kölbchens mit Milchsäure-Ammoniaknährboden aus dem eine Stufe älteren wieder herzustellen. Im Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden gelang es in wiederholten Versuchen nur einmal, einen der drei Stämme zur Vermehrung zu bringen, die beiden anderen wuchsen überhaupt nicht, gerade so wenig wie die Typhusstämme und im Gegensatz zu den Paratyphus B-Stämmen. Ebenso zeigten die ammoniakassimilierenden Paratyphus A-Bacillen im Äpfelsäure-Ammoniaknährboden im allgemeinen kein Wachstum, nur mit einem der Stämme (aber nicht mit dem gleichen, der im Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden gewachsen war) konnte einmal Vermehrung in Passagen erzielt werden, bei anderen Versuchen mit dem gleichen Stamm aber nicht. In diesen beiden letztgenannten Nährböden sind also entgegen dem Verhalten der Paratyphus B-Bacillen zwei der Paratyphus A-Stämme überhaupt nicht gewachsen und einer nur gelegentlich und sehr schwach. Etwas anders liegen die Verhältnisse im Citronensäure-Ammoniaknährboden. Auch hier zeigte ein Stamm überhaupt kein Wachstum, die beiden anderen aber sind ganz besonders schnell und üppig gediehen. Hier also haben wir es mit einem isolierten Ausfall eines Stammes innerhalb der gleichen Art hinsichtlich einer bestimmten, sonst sehr ausgesprochenen Fähigkeit zu tun; und es verdient vermerkt zu werden, daß es sich hier gerade um dieselbe Funktion, nämlich die Citronensäureverwertung, handelt, die auch bei ammoniakassimilierenden Typhusstämmen nur einzelnen Keimen innerhalb der Kultur zukam. Dieser die Citronensäure nicht angreifende Stamm ist derselbe, der die *Seitz*sche „Lackmusmolke" nicht bläute. Da diese, außer dem für Paratyphus A-Bacillen nicht in Betracht kommenden Milchzucker, als Kohlenstoffquelle nur eine Spur Traubenzucker und die Citronensäure enthält, so wird es verständlich, warum dieser Stamm darin kein Alkali bildete. (S. I. Mitteilung, I. Teil, b.) Im Glycerin-Ammoniaknährboden gediehen gerade wie die ammoniakassimilierenden Typhusstämme und die Paratyphus B-Bacillen auch die ammoniakassimilierenden Paratyphus A-Stämme gut, wenn auch nicht jedesmal bei der ersten Übertragung vom Nähragar aus. Aber die Fortzüchtung in Passagen begegnete noch größeren Schwierigkeiten als bei den Typhusstämmen; denn die darin schnell und kräftig bis zur dichten Trübung wachsenden Keime starben sehr schnell wieder ab; so konnten wir beobachten, daß eine innerhalb dreier Tage stark gewachsene Glycerin-Ammoniakkultur, die so viel lebende Keime enthielt, daß eine Öse davon, auf ein Schrägagarröhrchen ausgestrichen, einen dichten zusammenhän-

genden Rasen, in dem einzelne Kolonien kaum erkennbar waren, aufgehen ließ, 2 Tage später nur noch vereinzelte, am 3. Tage überhaupt keine lebenden Keime in der gleichen Flüssigkeitsmenge enthielt. Die starke Säurebildung aus dem Glycerin wird wohl die Ursache dieser Schädigung der Keime sein, und dadurch wird die Schwierigkeit ihrer Fortzüchtung in Passagen erklärt. Für die Frage, wie weit diese aus Paratyphus A-Stämmen gewonnenen ammoniakassimilierenden Kulturen dem Paratyphus B-Bacillen gleichen, war ihr Verhalten im Arabinose-Ammoniaknährboden wichtig. Bei keinem der Stämme trat Wachstum auf; sie stimmen also in dieser Beziehung mit den Typhusstämmen überein und lassen sich leicht von den Paratyphus B-Stämmen unterscheiden.

Was nun die Verwertung des Nitrats als einziger Stickstoffquelle betrifft, so nähern sich in dieser Beziehung die ammoniakassimilierenden Paratyphus A-Stämme mehr den Paratyphus B-Bakterien als den Typhusstämmen. Ein Stamm wies keine Vermehrung in Milchsäure-Nitrat-Nährboden auf. Die beiden anderen dagegen konnten sich zwar nicht bei jedem Versuche, doch sobald das Anwachsen gelang, in Passagen vermehren. Das Wachstum war allerdings äußerst langsam, es bedurfte 2—3 Wochen, bis es zu schwacher Trübung des Nährbodens kam. Einen dieser beiden Stämme, der im Citronensäure-Ammoniaknährboden besonders gut wuchs, konnten wir auch im Citronensäure-Nitratnährboden zum Wachstum bringen, besonders wenn er direkt vom Citronensäure-Ammoniaknährboden dorthin übertragen wurde.

Was die Verwertung der Aminosäuren ohne gleichzeitig vorhandene andere Energiequelle anbelangt, so vermochten sich die ammoniakassimilierenden Paratyphus A-Stämme weder von Glykokoll noch von Leucin zu ernähren. Stand ihnen außerdem Milchsäure zur Verfügung, so trat besonders mit Leucin kräftiges Wachtum auf. Die Asparaginsäure allein genügte nur einem Stamm, um kümmerlich in einigen Passagen zu gedeihen. Bei gleichzeitig anwesender Milchsäure aber zeigten alle drei eine üppige Vermehrung. Geradeso lagen, wie erinnerlich, die Verhältnisse bei den ammoniakassimilierenden Typhusstämmen, während die Paratyphus B-Bacillen anspruchsloser waren. Ein auffallend schlechtes Wachstum der ammoniakassimilierenden Paratyphus A-Stämme trat mit Alanin zutage; ein Stamm war überhaupt nicht in Passagen zur Vermehrung zu bringen, die beiden anderen wuchsen nur sehr langsam, während doch das Alanin den ammoniakassimilierenden Typhus- und Paratyphus B-Bacillen gute Wachstumsmöglichkeit bot.

Die Harnstoffverwertung in solchen einfachen Nährböden, in denen er die einzige Stickstoffquelle darstellte, ergab bei den Paratyphus A-Stämmen schwankende Resultate; ein Stamm vermehrte sich im Harnstoff-Milchsäurenährboden in Passagen, die beiden anderen wuchsen

Tabelle IV.

Die Verwertung verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen durch ammoniak-assimilierende und ammoniak-nicht-assimilierende *Paratyphus A-Bacillen.*

Kohlenstoffquelle		Essigsäure	Oxalsäure	Milchsäure	Bernsteinsäure	Äpfelsäure	Citronensäure	Glycerin	Arabinose	Milchsäure	Glykokoll	Milchsäure	Alanin	Milchsäure	Asparaginsäure	Milchsäure	Leucin	Milchsäure	Milchsäure
Stickstoffquelle		Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Nitrat		Glykokoll		Alanin		Asparaginsäure		Leucin	Harnstoff
Ammoniak-assimilierende Paratyphus A-Bacillen	Stamm 1	0	0	+	0+?	0	0	+	0	+	0	+	+		0	+	0	+	0
	Stamm 2	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0		0	+	0	+	0+
	Stamm 3	0	0	+	0	0+?	+	+	0	0	0	+	+		0+	+	0	+	0
Ammoniak-nicht-assimilierend. Paratyphus A-Bacillen	Stamm 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0+	0	0+	0
	Stamm 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0+	0

Zeichenerklärung: + bedeutet Wachstum in zahlreichen Passagen. 0 bedeutet kein Wachstum. $\left.\begin{matrix}0+\\+0\end{matrix}\right\}$ bedeutet, der betreffende Stamm ist in mehrmaligen Versuchen einmal gewachsen, ein anderes Mal nicht. 0+ bedeutet, daß er in der Mehrzahl der Versuche nicht gewachsen, +0, daß er in der Mehrzahl der Versuche gewachsen ist. Wo jeder Vermerk fehlt, sind die betreffenden Versuche mit dem Stamm nicht ausgeführt worden. (+) bedeutet, daß die Vermehrung des Stammes nur auf dem Umweg über einen anderen einfachen künstlichen Nährboden und nicht vom Nähragar direkt zu erreichen war.

entweder gar nicht oder waren nicht in Passagen fortzüchtbar; hier sehen wir also wieder Verhältnisse, die denen bei ammoniakassimilierenden Typhusstämmen ähneln und von den bei Paratyphus B-Bakterien beobachteten verschieden sind.

Fassen wir die Ergebnisse dieser Versuche in einfachen künstlichen Nährböden zusammen: Die untersuchten ammoniakassimilierenden Paratyphus A-Stämme haben andere Ernährungsbedürfnisse als die Paratyphus B-Bacillen und stehen vielmehr den ammoniakassimilierenden Typhusstämmen sehr nahe. Die folgende Tabelle IV gibt einen abschließenden Überblick über die speziellen Versuchsresultate mit Paratyphus A-Bacillen. Die ammoniakassimilierenden Stämme 1 und 2 sind aus den ammoniaknichtassimilierenden Stämmen 1 und 2 gewonnen.

Nach Herkunft der Stämme, ihrem agglutinatorischen Verhalten und ihren Ernährungsbedürfnissen in einfachen künstlichen Nährböden besteht also kein Zweifel, daß es sich hier um ammoniakassimilierende Paratyphus A-Stämme handelt. Es gibt demnach auch unter den ParatyphusA-Bacillen Keime mit tiefgreifenden ernährungsphysiologischen Verschiedenheiten, wie sie die Fähigkeit der Ammoniakassimilation gegenüber dem Bedarf organischer Stickstoffverbindungen bedeutet.

III. Teil.

Die Ernährungsbedürfnisse der Shiga-Kruse-Dysenteriebacillen und die Toxinbildung unter einfachsten Ernährungsbedingungen.

a) Das Vorkommen ammoniak-assimilierender und nicht-ammoniak-assimilierender Shiga-Kruse-Stämme und ihr Verhalten in Lackmusmolke.

Aus der Arbeit von *Kisch*[1]) und unseren früher mitgeteilten Versuchen[2]) wissen wir, daß es auch unter den Shiga-Kruse-Bacillen ammoniakassimilierende und ammoniaknichtassimilierende Stämme gibt. Wir haben deshalb unsere Untersuchungen an diesen Bakterien fortgesetzt, um zu erfahren, ob die bei den Typhus- und Paratyphus A-Bacillen gefundenen genetischen Beziehungen zwischen dem anspruchslosen und anspruchsvolleren Typ auch hier zu beachten sind; die Ruhrbacillen stehen den Typhusbakterien ja nicht so nahe, wie die Paratyphus A-Bacillen, und es käme also, wenn auch hier ähnliche Verhältnisse herrschen, unseren Beobachtungen eine allgemeinere, über den Bereich einer Bakterienart und seiner nächsten Verwandten hinausreichende Bedeutung zu.

Wir haben für diese Versuche acht Shiga-Kruse-Dysenteriestämme von typischem kulturellem und serologischem Verhalten herangezogen. Davon konnten wir fünf im Milchsäure-Ammoniaknährboden dauernd zum Wachstum bringen, drei hingegen konnten sich nicht in Passagen vermehren. Wir finden also auch hier innerhalb einer Art ernährungs-

[1]) [2]) l. c.

physiologisch verschieden befähigte Stämme. Serologisch haben wir keine Unterschiede zwischen diesen beiden Typen beobachtet; wir finden also ganz den bei Typhus- und Paratyphus A-Bakterien entsprechende Verhältnisse. Wir erinnern uns der bei diesen Bakterien beobachteten Erscheinungen in der Lackmusmolke, wo Typhus- und sogar Paratyphus A-Stämme entgegen der als typisch geltenden dauernden Säuerung nach längerer Bebrütung auch Alkali bildeten; wir haben diese in der künstlichen „Lackmusmolke" als Folge der Ammoniakassimilation erkannt. Gilt dies auch für die Shiga-Kruse-Bacillen? Auch bei diesen wird eine schwache dauernde Rötung der Lackmusmolke als charakteristisch betrachtet. Bei einigen der ammoniakassimilierenden Shiga-Krusestämme konnten wir aber nach 7—9 Tage langer Bebrütung einen Umschlag der natürlichen Lackmusmolke in *Blau* beobachten. Wir wissen nicht, worauf die Alkalibildung in diesem komplizierten Nährboden unbekannter Zusammensetzung zurückzuführen ist. Deshalb haben wir wieder die künstliche *Seitz*sche „Lackmusmolke" herangezogen. Darin aber konnten wir zwischen ammoniakassimilierenden und ammoniaknichtassimilierenden Shiga-Kruse-Stämmen auch nach wochenlanger Bebrütung keinen Unterschied bemerken; bei Züchtung in flacher Schicht trat am 2. oder 3. Tag eine intensive Rötung auf, ohne daß es bei einem der Stämme zur Alkalibildung kam. Es schien also die für die Typhus- und Paratyphusgruppe aufgefundene Beziehung zwischen Ammoniakassimilation und Alkalibildung in der künstlichen „Lackmusmolke" hier keine Gültigkeit zu haben. Die später zu besprechenden eingehenden Versuche über die Ernährungsbedürfnisse der Shiga-Kruse-Bacillen erklärten aber diese unerwartete Beobachtung ohne weiteres. Es stellte sich nämlich heraus, daß diese Bakterien die Citronensäure nicht anzugreifen vermögen, oder höchstens in seltenen Fällen auf Umwegen dazu zu bringen waren. Also konnten sie in der *Seitz*schen „Lackmusmolke", die ja ein Citronensäure-Traubenzucker-Ammoniaknährboden mit Milchzucker und Peptongehalt ist, nach Verbrauch der minimalen Traubenzucker- und Peptonmengen überhaupt nicht weiter wachsen und nicht, wie Paratyphus-B-Bakterien und manche Typhus- und Paratyphus-A-Bacillen, aus Ammoniumsulfat und Natriumcitrat alkalische Stoffwechselprodukte bilden. Die ammoniaknichtassimilierenden Shiga-Kruse-Stämme können also in der künstlichen „Lackmusmolke" kein Alkali bilden, weil sie das Ammoniak und die Citronensäure nicht verwerten können, und die ammoniakassimilierenden Stämme können sie ebenfalls nicht bläuen, weil ihnen die Citronensäureverwertung unmöglich ist. Es ist also klar, warum die ammonikassimilierenden Shiga-Kruse-Stämme in der *Seitz*schen künstlichen „Lackmusmolke" keinen Farbumschlag hervorrufen.

Gelingt es nun auch hier aus ammoniaknichtassimilierenden Stämmen ammoniakassimilierende zu gewinnen? Es wurde nach der an Typhus- und Paratyphus A-Bacillen erprobten Methode der ganze Rasen eines Schrägnähragarröhrchens in 4 ccm des Milchsäure-Ammoniaknährbodens eingerieben und diese dichte Bakterienemulsion bebrütet. Nach 6, 10 und 17 Tagen der Bebrütung wurde versucht, daraus durch Übertragung von mehreren Ösen Passagen im Milchsäure-Ammoniaknährboden zu erzielen. Bei zwei der ammoniaknichtassimilierenden Stämme hatten wir damit keinen Erfolg; beim dritten aber gelang es, zwar nicht nach 6, wohl aber nach 10 und 17 Tagen eine ammoniakassimilierende Kultur zu gewinnen: Eine Woche lang blieb der neu beimpfte Milchsäure-Ammoniaknährboden wasserklar; dann trat eine deutliche Trübung auf, und es ließen sich die in Reinkultur herangewachsenen Shiga-Kruse-Bacillen unter diesen einfachen Ernährungsbedingungen von Passage zu Passage weiter fortzüchten. Auch hier ist also eine Anreicherung der zur Ammoniakassimilation befähigten Bakterien im Milchsäure-Ammoniaknährboden nach massiger Beimpfung gelungen, und damit der Beweis erbracht, daß auch bei den Shiga-Kruse-Bacillen die Individuen eines Stammes verschiedene Befähigung aufweisen können. Unsere an Typhus- und Paratyphus A-Bacillen gemachte Beobachtung hat also an Ruhrbacillen eine Erweiterung erfahren. Auch hier werden wir wieder eine Abstammung der einen Keime von den anderen annehmen müssen, denn die ammoniaknichtassimilierenden Stämme sind durch mehrmalige Reinzüchtung aus einer isolierten Kolonie gewonnen worden und enthalten doch Individuen verschiedener Leistungsfähigkeit. Auch hier unterscheiden sich die einzelnen Shiga-Kruse-Stämme dadurch, daß einige so viele zur Ammoniakassimilation befähigte Keime enthalten, daß sie schon bei kleiner Einsaat in den Milchsäure-Ammoniaknährboden wachsen, andere nur wenige Keime dieser Fähigkeit aufweisen und deshalb nur nach massiger Einsaat dieser Kulturen in den einfachen Nährböden wachsen und wieder andere überhaupt keine oder nur so wenige ammoniakverwertende Keime besitzen, daß diese nicht nachweisbar sind.

b) Die Ernährungsbedürfnisse der ammoniakassimilierenden Shiga-Kruse-Stämme.

Wir haben nunmehr die ammoniakassimilierenden Shiga-Kruse-Stämme in ihren ernährungsphysiologischen Eigenschaften in einfachen künstlichen Nährböden untersucht und wollen sie mit den Paratyphus- und Typhusbacillen vergleichen. Sie sind in den meisten der zur Untersuchung der Typhusbacillen benützten Nährböden, deren genaue Zusammensetzung dort angegeben ist, geprüft worden. Es zeigte sich, daß die Shiga-Kruse-Bacillen ganz erheblich anspruchsvoller sind als die bisher untersuchten Bakterienarten. Sie sind schwerer in Nähr-

böden mit wenigen einfachen Nährstoffen züchtbar, die Passagen reißen gelegentlich ohne erkennbaren Grund ab und öfters wachsen die Bakterien bei der Beimpfung eines solchen Nährbodens vom Nähragar erst nach mehrmaligen Versuchen an. Gegen erhöhten Alkaligehalt sind sie sehr empfindlich.

Im Essigsäure- und Oxalsäure-Ammoniaknährboden trat bei den vier geprüften Stämmen kein Wachstum auf. Sie stimmen also in dieser Beziehung mit den Typhusbacillen überein und sind von den Paratyphus B-Bakterien verschieden.

Im Milchsäure-Ammoniaknährboden zeigten sie ein langsam sich anbahnendes, dann aber recht kräftig werdendes Wachstum, das sich in vielen Passagen fortführen ließ. Bei einigen Stämmen kam es schon in 3—4 Tagen zur Trübung der Nährlösung, bei manchen mußte man bis zu 10 Tagen warten, bis dann innerhalb 48 Stunden der Nährboden trüb wurde; einzelne Stämme waren nicht bei jedem Versuche zur Vermehrung zu bringen. Die Bakterien senkten sich in älter werdenden Kulturen dieses Nährbodens zu Boden und bildeten dort einen schlierigen Bodensatz. Untersuchte man diesen mikroskopisch, so sah man sehr verschieden lange, bis zu ganz kurzen, dicken Stäbchen, die sich bei der Gramfärbung nicht ganz gleichmäßig entfärbten; eine daraus beimpfte Nähragarplatte zeigte große und kleine Kolonien und die gleichen Form- und Färbungsungleichheiten wie das Präparat aus dem einfachen künstlichen Nährboden; doch waren beide Kolonien, wie die kulturelle und serologische Prüfung ergab, Shiga-Kruse-Bacillen. Dieselben Beobachtungen waren auch in älteren Kulturen der gleichen Stämme auf Nähragar zu machen.

Im Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden fand keine Vermehrung statt. Es sind also in diesem Nährboden von den bis jetzt untersuchten Bakterien nur die Paratyphus B-Bacillen und diese sämtlich und sehr üppig gewachsen, die ammoniakassimilierenden Typhus- und Paratyphus A-Stämme dagegen gerade wie die Shiga-Kruse-Stämme nicht gediehen.

Aber auch im Äpfelsäure-Ammoniak- und im Citronensäure-Ammoniaknährboden konnte zunächst keine dauernde Vermehrung der Shiga-Kruse-Bacillen beobachtet werden. Die Paratyphus B-Bacillen wachsen in beiden Nährböden vorzüglich, der ammoniakassimilierende Typhusbacillus im ersten sehr schlecht oder gar nicht, im zweiten gut, der Paratyphus A-Bacillus im ersteren nicht, im zweiten nur ein Teil der Stämme, und die hier untersuchten Shiga-Kruse-Bacillen in keinem von beiden. Dieses Resultat ist bemerkenswert, und wir versuchten deshalb, ob es nicht doch auf Umwegen zum Wachstum dieser Bakterien in diesen Nährböden kommen kann. Die Ammoniakassimilation macht den Shiga-Kruse-Bacillen offensichtlich erhebliche Schwierigkeiten, denn sie wachsen in allen diesen einfachen künstlichen Nährböden nur zögernd; dagegen wird

die Vermehrung mit fortschreitender Passagenzahl schneller. Auch hier ist es wohl berechtigt, daraus auf eine verschiedene Befähigung der einzelnen Keime und eine allmähliche Anreicherung der besonders leistungsfähigen zu schließen. Es lag bei dieser Auffassung der Gedanke nahe, nach einigen Passagen im Milchsäure-Ammoniaknährboden die Keime von dort aus in den Äpfelsäure- oder Citronensäure-Ammoniaknährboden zu bringen. Denn man konnte annehmen, daß nach einer im Milchsäure-Ammoniaknährboden erfolgten Anreicherung der zur Ammoniakassimilation besonders befähigten Keime diese nun mit einer schlechter ausnützbaren Kohlenstoffquelle als der Milchsäure doch vielleicht zur Vermehrung kommen; es wäre ihnen dann gewissermaßen von zwei Schwierigkeiten, nämlich der Verwertung erstens des Ammoniaks und zweitens der offenbar wenig geeigneten Kohlenstoff- und Energiequelle, wie es die Äpfel- oder Citronensäure im Gegensatz zur Milchsäure ist, die zweite Schwierigkeit durch vorherige Anreicherung der zur Ammoniakassimilation besonders befähigten Keime erleichtert. Vom gleichen Gedankengang ausgehend, haben wir daher auch umgekehrt sonst grundsätzlich von demselben Nährboden, nämlich dem *Nähragar*, alle einfachen Nährlösungen beimpft, um gleichmäßige Verhältnisse zu schaffen und nicht irgendwie ausgewählte Keime als Einsaat zu verwenden. Die Versuche ergaben nun tatsächlich, daß diese Gedankengänge nicht ganz unberechtigt waren: während im Äpfelsäure-Ammoniaknährboden, solange er vom Nähragar beimpft wurde, von zwei Stämmen der eine gar nicht, der andere nicht in Passagen züchtbar war, gelang es bei beiden nach der Übertragung aus dem Milchsäure-Ammoniaknährboden in dem Äpfelsäure-Ammoniaknährboden Passagen zu erzielen; die Trübung entwickelte sich zwar langsam, wurde aber deutlich. Ebenso gelang es auf diese Weise, von vier im Citronensäure-Ammoniaknährboden nach der Beimpfung vom Nähragar nicht wachsenden Stämmen darin wenigstens einen nach der Einsaat aus einer ersten Passage im Milchsäure-Ammoniaknährboden zu kräftiger Vermehrung in Passagen zu bringen. Entsprechende Versuche, auch im Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden die Shiga-Kruse-Bacillen auf diese Weise zum Wachstum zu bringen, sind aber bemerkenswerterweise gescheitert. Auf keinem Weg ist es uns also gelungen, die Typhus- und Shiga-Kruse-Bacillen zur Verwertung der Bernsteinsäure als einziger Kohlenstoffquelle zu veranlassen.

Im Glycerin-Ammoniak-Nährboden zeigten vier Shiga-Kruse-Stämme üppiges Wachstum. Es wachsen dort die Bakterien ganz besonders gut, doch sterben die Kulturen wohl infolge der schnell auftretenden sauren Reaktion rasch ab, so daß Passagen Schwierigkeiten bereiten.

Die ammoniaknichtassimilierenden Shiga-Kruse-Stämme sind in keiner der bis jetzt besprochenen Nährlösungen gewachsen. Im Glycerin-

Ammoniaknährboden ist aber ein Stamm, aus dem die Abspaltung einer ammoniakassimilierenden Kultur gelang, gelegentlich auch schon bei kleiner Einsaat gewachsen. Es zeigt dies, daß je leichter ausnützbar die Kohlenstoff- und Energiequelle ist, desto leichter die Ammoniakassimilation bewerkstelligt wird. *Es legt also diese Beobachtung die Auffassung nahe, daß die Fähigkeit der Ammoniakverwertung allen Keimen in kleinerem oder größerem Maße zukommt.* Sind die sonstigen Ernährungsverhältnisse sehr günstig, so gelingt es vielen Keimen, das Ammoniak zu assimilieren: es wächst in unserem Beispiel ein Shiga-Kruse-Stamm gelegentlich schon bei kleiner Einsaat im Glycerin-Ammoniaknährboden; ist die Energiegewinnung für das Bakterium aus irgendeinem Grunde schwieriger, so gelingt es offenbar nur noch wenigen Keimen, das Ammoniak zu verwerten: derselbe Shiga-Kruse-Stamm wächst im Milchsäure-Ammoniaknährboden nur nach massiger Einsaat und so erfolgter Anreicherung besonders befähigter Individuen. Werden nun die Ernährungsbedingungen noch schlechter, so ist eine noch schärfere Auswahl der Keime notwendig, und es gelingt in einem solchen Nährboden nur noch durch Beimpfung aus einem anderen ammoniakhaltigen, mit besser ausnützbarer Kohlenstoffquelle versehenen Nährlösung, Wachstum zu erzielen: so sind einzelne Stämme im Äpfel- oder Citronensäure-Ammoniaknährboden nur dann gediehen, wenn sie aus dem Milchsäure-Ammoniaknährboden dorthin übertragen wurden.

Von den Kohlenhydraten bot die Arabinose deshalb ein Interesse, weil ihre Verwertung ein Unterscheidungsmerkmal zwischen ammoniakassimilierenden Typhus- und Paratyphus A-Bacillen einerseits und den Paratyphus B-Bacillen andererseits ergeben hat. Auch die untersuchten Shiga-Kruse-Stämme konnten im Arabinose-Ammoniaknährboden nicht gedeihen.

Das Nitrat konnte von dem ammoniakassimilierenden und ammoniaknichtassimilierenden Shiga-Kruse-Stämmen nicht verwertet werden. Sie sind weder im Milchsäure-Nitrat-, noch im Traubenzucker-Nitrat-, noch im Glycerin-Nitratnährboden gewachsen, obgleich alle drei Kohlenstoffverbindungen für sie gut ausnützbar sind. Auch hierin decken sie sich also mit den Typhusbacillen.

In den aminosäurehaltigen Nährböden zeigten sich die Shiga-Kruse-Bacillen anspruchsvoller als die bisher untersuchten Arten. Je zwei untersuchte Stämme sind weder mit Glykokoll, noch mit Asparaginsäure, noch mit Alanin, noch mit Leucin gewachsen, wenn nicht eine zweite Energiequelle zur Verfügung stand. Die ammoniakassimilierenden Typhusbacillen konnten sich, wie erinnerlich, sehr wohl aus Alanin oder Asparaginsäure vermehren. Nach dem Zusatz von 0,5% Natriumlactat sind aber die ammoniakassimilierenden Shiga-Kruse-Bacillen mit den vier genannten Aminosäuren in Passagen gewachsen, wobei mit Ausnahme

des Alaninnährbodens die Trübung recht kräftig wurde. Auffallend war das zögernde Wachstum im Alanin-Milchsäurenährboden, in dem nur zwei von vier Stämmen in Passagen wachsen konnten. In keinem dieser aminosäurehaltigen Nährböden ist der geprüfte ammoniaknichtassimilierende Stamm gewachsen. Dieser war erst, wie wir früher schon berichtet haben, mit Tryptophan zur Vermehrung zu bringen. Mit dem uns von Herrn Prof. *Neuberg* überlassenen Präparat wuchs er auch ohne Milchsäure und ohne Zusatz von Sulfat kräftig.

Die Tabelle V faßt an einer Auswahl der untersuchten Stämme die eben besprochenen Resultate zusammen.

Wir haben im vorhergehenden die Fähigkeiten der Shiga-Kruse-Bacillen, bestimmte Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen als Nährstoffe zu gebrauchen, geprüft und sie darin mit andern pathogenen Keimen verglichen. Dies war dank des Vorkommens ammoniakassimilierender Stämme möglich, weil solche in Nährböden züchtbar sind, die nur *eine* Kohlenstoffquelle enthalten. Dabei ist natürlich zu bedenken, daß diese Resultate nur für die vorliegenden Verhältnisse Geltung haben, und man unsern Versuchen nicht entnehmen kann, ob nicht bei Gegenwart bestimmter anderer, von uns nicht geprüfter Substanzen, die

Tabelle V.

Die Verwertung verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen durch ammoniakassimilierende und ammoniaknichtassimilierende Shiga-Kruse-Bacillen.

Kohlenstoffquelle		Essigsäure	Oxalsäure	Milchsäure	Bernsteinsäure	Äpfelsäure	Citronensäure	Glycerin	Arabinose	Milchsäure	Glykokoll	Milchsäure	Alanin	Milchsäure	Asparaginsäure	Milchsäure	Leucin	Milchsäure
Stickstoffquelle		Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Nitrat		Glykokoll		Alanin		Asparaginsäure		Leucin
Ammoniakassimil. Shiga-Kruse-Bacillen	Stamm 1	0	0	+	0	0(+)	0(+)	+	0	0	0	+	0	?	0	+	0	+
	Stamm 2	0	0	+	0	0(+)	0	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+
Ammoniaknichtassimil. Shiga-Kruse-Bacillen	Stamm 1	0	0	0	0	0	0	0+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Der in dieser Tabelle enthaltene ammoniaknichtassimilierende Shiga-Kruse-Stamm ist die Kultur, aus welcher die Anreicherung ammoniakassimilierender Individuen gelang. Zeichenerklärung wie in Tabelle IV.

in unseren einfachen Nährböden vom Shiga-Kruse-Bacillus nicht verwerteten Stoffe, z. B. Bernsteinsäure oder Citronensäure, doch als Nährstoffe benutzt werden können. Denn auch aus unseren Versuchen wissen wir von manchen Nährstoffen, daß sie erst dann verwertbar werden, wenn außerdem noch eine andere Substanz gleichzeitig verfügbar ist.

c) Toxinbildung in einfachen künstlichen Nährböden.

Nachdem die Ernährungsbedürfnisse der Shiga-Kruse-Bacillen systematisch untersucht worden sind, bot sich bei diesen Bakterien die Gelegenheit, auf der dadurch gewonnenen Grundlage die Frage zu prüfen, ob unter den einfachsten Ernährungsverhältnissen, beim Aufbau aus wenigen einfachen Substanzen, Toxin gebildet wird.

Das Studium der Toxinbildung unter übersichtlichen Ernährungsverhältnissen war ja der eigentliche Ausgangspunkt der alten Untersuchungen von *Uschinsky*[1]), der deshalb als erster toxinbildende Keime in einfachen künstlichen Nährböden zu züchten versuchte. Er gibt an, Tetanus- und Diphtherietoxin in solchen Nährlösungen gewonnen zu haben, doch konnten seine Versuche später nicht bestätigt werden, da diese Bakterien unter so einfachen Ernährungsbedingungen nicht zum Wachstum zu bringen waren. Auch uns ist dies in unseren Nährböden trotz wiederholter Versuche mit Diphtheriebacillen nicht gelungen.

Bei den Shiga-Kruse-Bacillen war jetzt Gelegenheit zu solchen Versuchen gegeben. Denn das Vorkommen ammoniakassimilierender Stämme gestattete es, sehr einfach zusammengesetzte Nährböden zu benutzen. In der Arbeit von *Dörr*[2]) über das Dysenterietoxin findet sich die Angabe, daß die Shiga-Kruse-Bacillen in dem ziemlich komplizierten, von *Uschinsky* angegebenen Nährboden, der ein Glycerin-Milchsäure-Asparaginsäure-Ammoniaknährboden ist, kein Gift bilden, und auch die darin aufgewachsenen Bakterien selbst nicht giftig sind.

Als Versuchstiere haben wir Kaninchen benutzt, die bekanntlich am empfindlichsten gegen das Dysenteriegift sind. Ihr Gewicht betrug 1000—1500 g, in einzelnen Versuchsreihen wurden Tiere von 750 g benützt. Das Gift wurde intravenös injiziert. Wir wählten einen ammoniakassimilierenden Shiga-Kruse-Stamm aus, der in Nährbouillon reichlich Gift bildete. Das Gift selbst haben wir auf zwei verschiedenen Wegen gewonnen. In Anlehnung an die Methode von *Neisser-Shiga*[3]) wurden ältere, 12—17 Tage alte Kulturen in flüssigen Nährböden eine Stunde lang bei 60° gehalten und so die Bakterien abgetötet und dabei ihre Leiber ausgelaugt; unmittelbar darauf wurde scharf zentrifugiert, bis eine opalisierende Flüssigkeit entstand. Oder es wurden die unerhitzten

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **14**. 1893.
[2]) *Dörr*, Das Dysenterietoxin. Jena 1907.
[3]) *M. Neisser* u. *Shiga*, Dtsch. med. Wochenschr. 1903.

Kulturen durch *de Haën*sche Filter (Nr. 10) filtriert und die sterilen Filtrate auf Giftigkeit geprüft.

Wir hatten agarfreie flüssige Nährböden zu verwenden, denn wir mußten an dem Standpunkt festhalten, daß nur diese dem Grundsatz bekannter und konstanter Nährbodenzusammensetzung entsprechen. Zunächst haben wir eine komplizierte Nährlösung aus 0,5% Kochsalz, 0,2% Phosphatgemisch, 0,5% Ammoniumsulfat, 0,5% Natriumlaktat, 0,2% Asparaginsäure, 0,2% Alanin und 0,2% Leucin und der nötigen Menge Natriumcarbonat zusammengesetzt; sie enthielt also vielerlei für den Shiga-Kruse-Bacillus nachgewiesenermaßen ausnutzbare Nährstoffe. Außerdem haben wir gleichzeitig den einfachsten künstlichen Nährboden, in welchem diese Bakterien noch wachsen, den Milchsäure-Ammoniaknährboden, der nur 0,5% Kochsalz, 0,2% Phosphatgemisch und 0,6% Ammoniumlactat enthielt, zu diesen Versuchen benützt. Die verwendeten Kulturen waren 12—17 Tage alt und stellten zweite oder dritte Passagen in diesen Nährböden dar.

In Nährbouillon und in diesen beiden aus bekannten Stoffen zusammengesetzten Nährböden, dem komplizierten und dem einfachen, wurden ganz übereinstimmende Beobachtungen gemacht. Sowohl die 1 Stunde auf 60° erhitzten Kulturen wie die keimfreien Filtrate lebender Kulturen waren giftig. In Mengen von 0,5—1,0 ccm riefen sie charakteristische Krankheitserscheinungen an Kaninchen hervor und töteten sie meistens. Nur einige Tiere konnten sich wieder erholen. Ein Teil von ihnen bekam 3—6 Stunden nach der Injektion starke Durchfälle, fraß nicht mehr, so daß schnell beträchtliche Gewichtsverluste eintraten; nach 24 Stunden, manchmal erst am 3. Tag, traten Paresen auf, die an den Vorder- oder Hinterbeinen begannen. Dann kam es schnell zur völligen Lähmung der Extremitäten und auch der Nacken-und Halspartie. Die Tiere lagen auf der Seite, ohne ein Glied oder den Kopf bewegen zu können, dieser sank, wenn man sie aufnahm, schlaff herunter. Die meisten Tiere starben in diesem Zustand. Fütterte man sie sorgfältig — die Kau- und Schluckmuskulatur pflegte intakt zu sein —, so konnte man gelegentlich solche Tiere trotz 5 Tage anhaltender völliger Lähmung durchbringen, wobei dann die Erscheinungen ziemlich plötzlich zurückgingen. Die intravenöse Injektion der entsprechenden Menge unbeimpften Nährbodens machte keine Krankheitserscheinungen. Die Sektion der Kaninchen hat nichts Besonderes ergeben: Der Darm war bei allen Tieren gerötet, seine Gefäße stark injiziert, und zwar konnte sowohl der Dünn- wie der Dickdarm betroffen sein; beim Aufschneiden des Darmes sah man den Stuhl öfters von einer dicken Schleimschicht eingehüllt und fand auch manchmal auf den festen Kotballen blutige Auflagerungen, sichere Darmgeschwüre oder gar ausgedehnte Nekrosen haben wir in keinem Falle beobachten können.

Weitere Versuche zeigten, daß sich diese giftige, in dem einfachsten künstlichen Nährboden gebildete Substanz durch spezifisches Immunserum neutralisieren läßt. Wir mußten aus Tiermangel zu dieser Versuchsreihe große, bis über 2 kg schwere Kaninchen benützen. Das aus einer 12 Tage alten Milchsäure-Ammoniak-Kultur durch Filtration gewonnene Toxin wurde mit größeren Mengen antitoxischen polyvalenten Ruhrserums (Höchst) neutralisiert, 2 Stunden bei 37° stehen gelassen und dann injiziert. Ein Tier erhielt 2 ccm Gift und 3 ccm Immunserum. Es zeigte keine Krankheitserscheinungen. Ein zweites Tier bekam gleichzeitig ebenfalls 2 ccm Gift mit 3 ccm Normal-Pferdeserum gemischt; es ging nach 5 Stunden unter starken Durchfällen ein. Ein drittes Kaninchen bekam die gleiche Giftmenge mit 3 ccm physiologischer Kochsalzlösung gemischt und ebenfalls 2 Stunden bei 37° gehalten; es erkrankte nach 6 Stunden unter mäßigen Durchfällen, zeigte am nächsten Tag eine Parese der Hinterbeine, ohne daß es zu Lähmungen kam, verlor bis zum 2. Tag ein Viertel seines Anfangsgewichtes, erholte sich aber wieder.

Wir konnten also beobachten, daß unter ganz einfachen Ernährungsbedingungen von den Shiga-Kruse-Bacillen eine für Kaninchen giftige Substanz gebildet wird. Dieses Gift ist in älteren, flüssigen Kulturen in wechselnder Menge vorhanden, wird bei 60° nicht zerstört und ruft die als typisch bekannten Krankheitserscheinungen hervor. Da es mit Antitoxin neutralisierbar ist, so muß es mit dem aus Bouillonkulturen bekannten *Dysenterietoxin* identisch sein. Damit ist der Nachweis gelungen, daß *die Bakterien auch bei der Ernährung mit ganz wenigen einfachen chemischen Körpern Toxin bilden können.*

Ernährungsphysiologische Versuche an Kolitisbacillen.

Im Anschluß an die Untersuchung des Shiga-Kruse-Dysenterie-Bacillus haben wir einige Versuche mit Kolitisbacillen gemacht; wir wollten feststellen, wie weit sie sich in diesen einfachen Nährböden von den Shiga-Kruse-Bacillen unterscheiden, und wie sie sich untereinander verhalten.

Diese aus Ruhrstühlen gezüchteten Stämme zeigten alle konstanten kulturellen Eigenschaften, wie sie in der Arbeit von *Braun* und *Liess*[1]) für Kolitisbacillen als charakteristisch beschrieben sind. Es waren gramnegative unbewegliche Stäbchen, sie wuchsen auf Nähragar in dichtem, nicht irisierendem Rasen, zeigten auf Löfflerserum weder Farbstoffbildung noch Verflüssigung, trübten die Bouillon diffus, verflüssigten Gelatine nicht, zeigten in Traubenzucker- und Milchzucker-Schüttelkulturen aerobes und anaerobes Wachstum und keine Gasbildung, bewirkten in der Lackmusmolke zuerst Rötung, nach einigen Tagen Bläuung, säuerten den Mannit-, aber nicht den Saccharose-Lackmusagar. Schwankend war die Indolbildung und die Maltosespaltung. Wir benützten zu diesen Versuchen 6 solche

[1]) *Braun* und *Liess*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **88**. 1919.

Kolitisstämme, welche bezüglich der letztgenannten unbeständigen Eigenschaften untereinander verschieden waren, und zwar trafen wir die Auswahl so, daß in dieser Beziehung Stamm 1 und 2 der Tabelle VI einander gleich, aber den anderen gegenüber verschieden waren, und ebenso Stamm 4, 5 und 6 sich untereinander glichen, sich aber von den übrigen unterschieden. Zur Agglutination wurden 2 Sera benützt, die mit möglichst verschiedenen Stämmen (Stamm 1 und 4) hergestellt worden waren. Das serologische Verhalten der hier benützten Stämme geht aus der Tabelle VI hervor, in der außerdem ihre unbeständigen Eigenschaften verzeichnet sind.

Diese Kolitisstämme haben wir in einigen einfachen Nährböden geprüft, die aus folgenden Gründen von Interesse zu sein schienen: Im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, weil darin von den bisher besprochenen Bakterien alle zur Ammoniakassimilation befähigten Keime gewachsen waren; im Bernsteinsäure-Ammoniak-Nährböden, weil sich darin nur die Paratyphus B- und nicht die Typhus-, Paratyphus A- und Shiga-Kruse-Bacillen vermehrten; im Äpfelsäure-Ammoniaknährboden, weil darin ebenfalls nur die Paratyphus B-Bacillen üppig, von den Typhus-, Paratyphus A- und Shiga-Kruse-Stämmen nur einige und diese sehr schlecht gediehen. Außerdem zogen wir den Citronensäure-Ammoniaknährboden heran, weil darin gerade die Shiga-Kruse-Bacillen gar nicht oder nur einzelne unter besonderen Bedingungen zum Wachstum kamen, und hierin auch beim Kolibacillus besondere Verhältnisse zu besprechen sein werden. Weiterhin war die Prüfung auf Denitrifikation von Interesse. Von den Aminosäuren

Tabelle VI.

Versuche über die Ernährungsbedürfnisse der Kolitisbacillen.

Stämme	*Indol*-bildung in Trypsin-bouillon	Spaltung von *Maltose* in Lackmus-Maltose-Agar	Agglutination durch: Immunserum von Stamm 1 bis zur Verdünnung	Agglutination durch: Immunserum von Stamm 4 bis zur Verdünnung	Wachstum in: *Milchsäure*-Ammoniak-Nährboden	Wachstum in: *Bernsteins.*-Ammoniak-Nährboden	Wachstum in: *Äpfelsäure*-Ammoniak-Nährboden	Wachstum in: *Citronensäure*-Ammoniak-Nährboden	Wachstum in: *Nitrat*-Milchsäure-Nährboden	Wachstum in: *Leucin*-Milchsäure-Nährboden	Wachstum in: *Harnstoff*-Milchsäure-Nährboden
1	—	+	1 : 3200	1 : 3200	+	+	+	0	0	+	+
2	+	+	1 : 3200	1 : 12800	0	0	0	0	0	0	0
3	—	0	1 : 1600	1 : 400	+	+	+	0	0	+	+
4	0	0	1 : 200	1 : 51200	+	+	+	0	0	+	0
5	0	0	1 : 3200	1 : 3200	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	1 : 1600	1 : 3200	0	0	0	0	0	0	0

haben wir nur das Leucin mit Milchsäure zusammen geprüft, da hiermit alle bisher beobachteten ammoniakassimilierenden Stämme gut wuchsen, und schließlich haben wir die Harnstoffverwertung im Harnstoff-Milchsäure-Nährboden untersucht, weil auch dabei Unterschiede unter den bereits besprochenen Bakterien beobachtet wurden. Wie sich die einzelnen Kolitisstämme in diesem Nährboden verhielten, geht aus Tabelle VI hervor. Man sieht, daß drei davon das Ammoniak zu assimi-

lieren vermögen, die drei anderen aber nicht. Diese Eigenschaft deckt sich weder mit der Indolbildung, noch mit der Maltosevergärung, entspricht also weder der alten Bezeichnung Typ Flexner noch Typ Y. Das Nitrat vermochte keiner der Stämme zu assimilieren. Im Leucin-Milchsäure-Nährboden wuchsen, wie zu erwarten war, die ammoniakassimilierenden Stämme; denn, wie wir bei der Besprechung der ammoniakassimilierenden Typhusbacillen hervorhoben, und es sich bei jeder bisher geprüften Bakterienart bestätigte, ist offenbar die Verwertung des Stickstoffs in den einfachen Aminosäuren eine Ammoniakassimilation. Im Harnstoff-Milchsäurenährboden sind von den sechs Stämmen nur zwei und begreiflicherweise zwei ammoniakassimilierende gewachsen; denn wie wir auch das bereits andeuteten, sind für die Vermehrung in diesem Nährboden wahrscheinlicherweise zwei Bedingungen zu erfüllen, 1. müssen die Stämme die Fähigkeit haben, den Harnstoff zu spalten, um ihn als Stickstoffquelle benützen zu können, und 2. müssen sie auch Ammoniak assimilieren können, da wahrscheinlich bei dieser Spaltung der Stickstoff als Ammoniak verfügbar wird. Dementsprechend konnten wir weder früher noch hier beobachten, daß ein ammoniaknichtassimilierender Stamm im Harnstoff-Milchsäurenährboden wächst, andererseits finden wir aber unter den ammoniakassimilierenden Stämmen, wie z. B. hier, sowohl solche, die sich darin vermehren, wie solche, die sich nicht vermehren können.

Wichtig erscheint uns schließlich das Verhalten der drei ammoniakassimilierenden Kolitisstämme in dem Äpfelsäure-, Citronensäure- und Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden. Mit Citronensäure ist zunächst keiner der untersuchten Stämme gewachsen. Die Kolitisbacillen entsprechen hierin also den Shiga-Kruse-Bacillen und sind mit diesen zusammen von den Typhus- und Paratyphus-Bakterien verschieden. Daß aber dieses Unvermögen, Citronensäure anzugreifen, nichts den Ruhrbakterien als solchen Charakteristisches ist, geht aus späteren Versuchen mit Colibacillen hervor. Im Äpfelsäure-Ammoniaknährboden waren diese drei Kolitisstämme zum Wachstum zu bringen, ebenso wie dies unter bestimmten Umständen mit einigen Shiga-Kruse-Stämmen gelang; im Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden aber vermehrten sich nur die ammoniakassimilierenden Kolitisbacillen, die ammoniakassimilierenden Shiga-Kruse-Stämme dagegen nicht. In diesen beiden letzten Nährlösungen und im Milchsäure-Ammoniaknährboden spielte nun die beim Shiga-Kruse-Bacillus bereits erwähnte Beobachtung eine große Rolle, daß die Keime darin leichter, manche Stämme sogar überhaupt nur dann wachsen konnten, wenn man sie nicht vom Nähragar, sondern von einem anderen ammoniakhaltigen, mit einer anderen Kohlenstoffquelle versehenen Nährboden übertrug. Bei zwei dieser Kolitisstämme wurden diese Beobachtungen zuerst gemacht und hier deshalb etwas

näher untersucht. Jeder dieser beiden Stämme (Stamm 1 und 4 der Tabelle VI) ergab, wenn die Abimpfung vom Nähragar erfolgte, bei verschiedenen Versuchsreihen auffällige Unregelmäßigkeiten im gleichen Nährboden und war z. B. im Milchsäure-Ammoniaknährboden einmal zum Wachstum zu bringen, das andere Mal nicht. Von Stamm 4 haben wir nun fünf Kulturen aus isolierten Kolonien einer Nähragarplatte gewonnen und jede von diesen in den Milchsäure-Ammoniak-, in den Bernsteinsäure-Ammoniak- und den Äpfelsaure-Ammoniaknährboden eingeimpft. Mit Milch- und Bernsteinsäure ist keine dieser fünf Kulturen gewachsen, mit Äpfelsäure dagegen drei. Mit jedem dieser drei Stämme haben wir nun aus der 2. Passage im Äpfelsäure-Ammoniak-Nährboden sowohl einen Milchsäure-Ammoniak-, wie Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden beimpft, in denen dieselbe Kultur vom Nähragar ausgehend nicht gewachsen war. Jetzt aber wuchsen alle drei sowohl mit Milchsäure wie mit Bernsteinsäure in Passagen. Diese Beobachtung ist nicht nur für die Methodik unserer Versuche wichtig gewesen, sondern sie war auch biologisch interessant. Wie wir dies bereits bei ähnlichen Versuchen mit Shiga-Kruse-Bacillen angedeutet haben, kann man sich hier, wo die Verhältnisse noch übersichtlicher liegen, diese Beobachtung folgendermaßen erklären:

Die Keime haben in diesen drei einfachen Nährböden eine doppelte Aufgabe: Sie müssen 1. die organische Verbindung spalten, um daraus die zum Leben nötige Energie zu gewinnen und ihren Kohlenstoffbedarf zu decken, und 2. das Ammoniak zum Aufbau verwenden. Die Notwendigkeit, das Ammoniak zu assimilieren, ist in den drei hier in Betracht kommenden Nährböden die gleiche. Die verschiedenen Kohlenstoffverbindungen machen aber offensichtlich für die Verwertung als Kohlenstoff- und Energiequelle verschieden große Schwierigkeiten. Daß die Fähigkeit zur Lösung der ersten Aufgabe, zur Ammoniakassimilation, bei den einzelnen Keimen desselben Stammes verschieden sein kann, haben wir bereits in zahlreichen Fällen beobachtet. Wir nehmen dasselbe hier an. Es mag nun diese Ammoniakverwertung um so mehr Keimen gelingen, desto leichter die gleichzeitig notwendige Energiegewinnung ist; es tritt demnach also in dem Nährboden am ehesten Wachstum auf, der die leicht ausnützbarste organische Verbindung enthält. Das ist hier offenbar die Äpfelsäure. Kommt es nun zur Vermehrung in diesem Nährboden, so reichern sich dabei die zur Ammoniakassimilation befähigten Keime an. Beimpft man nun aus diesem Nährboden einen anderen mit schlechter ausnützbarer Kohlenstoffverbindung — das ist hier die Milch- und Bernsteinsäure — so werden jetzt Keime übertragen, die sämtlich der ersten Aufgabe gewachsen sind und deshalb die zweite schwierigere jetzt mit besserem Erfolg bewältigen können, als wenn man vom Nähragar ausgeht und noch keine Auswahl der zur Ammoniakassimilation

besonders befähigten Keime stattgefunden hat. Ist diese Erklärung richtig, so müßte bei stärkster Einsaat vom Nähragar in den Milchsäure- oder Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden auch ohne den Umweg über den Äpfelsäure-Ammoniaknährboden eine Anreicherung der zur Milchsäure- resp. Bernsteinsäureverwertung wie zur Ammoniakassimilation befähigten Keime stattfinden. Das ist auch tatsächlich der Fall. Nach massiger Beimpfung dieser beiden Nährlösungen reicherten sich derartig beschaffene Keime ganz langsam an; nach 4 und 10 tägiger Bebrütung gelang noch keine Weiterzüchtung in diesen Nährböden. Am 16. Tag aber glückte es auf diese Weise, sowohl im Milchsäure-Ammoniak- wie im Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden hintereinander gelegte Passagen zu erzielen. Damit fand die obige Annahme eine experimentelle Stütze. Ähnliche Verhältnisse wurden bei dem Stamm 1 der Tabelle VI beobachtet. Bemerkenswert ist, daß z. B. bei den Shiga-Kruse-Bacillen nicht die Äpfelsäure, sondern die Milchsäure die bestausnützbare Verbindung war, und daß auch bei den verschiedenen Kolitisstämmen in dieser Beziehung unterschiedliche Beobachtungen gemacht wurden. — Es wird uns durch diese Erfahrungen verständlich, wieso derselbe Stamm einmal im Milchsäure-Ammoniaknährboden gut wachsen, das andere Mal keine Vermehrung zeigen kann.

Wir sehen also, daß auch die zu unseren Versuchen ausgewählten Kolitisstämme in ihrer Fähigkeit, das Ammoniak zu assimilieren, verschieden sind. Die einzelnen Keime eines Stammes können unterschiedliche Ansprüche zeigen, indem nicht alle bei Ammoniak als einziger Stickstoffquelle mit derselben Energiequelle auskommen können. Wir haben diese Versuche nur zur Ergänzung unserer Untersuchung der Shiga-Kruse-Bacillen angestellt, und es bedarf der Verwendungsstoffwechsel der Kolitisbacillen einer weiteren, systematischen Bearbeitung.

IV. Teil.

Untersuchungen über die Ammoniakassimilation einiger weiterer pathogener und saprophytischer Bakterienarten.

In einer früheren Veröffentlichung[1]) haben wir unter dem Gesichtspunkt eines Vergleiches mit Paratyphus B-Bacillen einige weitere teils pathogene, teils saprophytische Bakterienarten besprochen. Die damaligen Versuche wurden nur mit je einem bis höchstens drei Stämmen angestellt, da es sich dabei lediglich um eine Orientierung über die Frage handelte, wieweit unter den einzelnen Bakterienarten die Fähigkeit der Ammoniakassimilation verbreitet ist. Die gerade in dieser Beziehung bestehenden Schwankungen innerhalb der Art haben wir damals *nicht* berücksichtigt. Deshalb mußten auch diese Untersuchungen an einer

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. 86, H. 3. 1921.

größeren Zahl von Stämmen und mit den inzwischen an anderen Bakterien gemachten Erfahrungen in der Ausführung und Beurteilung der Versuche wieder aufgenommen werden. Es wurde die längere Bebrütungsdauer eingeführt, die Zahl der Passagen, aus denen auf eine dauernde Vermehrungsfähigkeit in dem betreffenden Nährboden geschlossen wurde, erhöht, und nur eine Opalescenz des Nährbodens, auch wenn sie in zahlreichen Passagen auftrat, *nicht* als zuverlässiges Zeichen der alleinigen Verwertung der zugesetzten Stickstoff- und Kohlenstoffquelle angesehen. Auf die Gründe, weshalb auf diese Punkte bei der Deutung der Versuche ein besonderes Gewicht gelegt werden muß, sind wir bereits in der Besprechung der Methodik (Siehe I. Mitteilung, Seite 233) ausführlich eingegangen.

Wir haben uns aber bei diesen den Typhus-, Paratyphus-, Ruhr-, Colibacillen nicht zugehörigen Arten auch diesmal nur auf die Frage der Ammoniakassimilation beschränkt.

Von **Friedländer-Bacillen** haben wir zu den zwei früher benützten noch drei weitere Stämme daraufhin geprüft, ob sie im Milchsäure-Ammoniaknährboden wachsen konnten, und es stellte sich heraus, daß sich alle untersuchten Stämme dieser Art, so wie es auch beim Paratyphus B- und den später zu besprechenden Colibacillen der Fall ist, unter diesen einfachen Ernährungsbedingungen dauernd vermehren können. Die einzelnen Stämme waren dabei in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit verschieden.

Die Reihe der pathogenen Keime haben wir mit den **Choleravibrionen** abgeschlossen. Diese hat bereits *Voges*[1]) auf asparaginhaltigen künstlichen Nährböden und *Kisch*[2]) mit Ammoniak, Weinsäure und Traubenzucker gezüchtet. Wir haben zu diesen Versuchen vier kulturell und serologisch typische Cholerastämme und zwei Kulturen des Vibrio *Metschnikoff* benützt. Früher hatten uns nur eine Cholera- und eine Metschnikoff-Kultur zur Verfügung gestanden, und wir hatten ernährungsphysiologische Verschiedenheiten dieser beiden Vibrionen beobachtet, indem die ersteren im Milchsäure-Ammoniaknährboden wuchsen, die letzteren nicht zu wachsen vermochten. Jetzt ist es also unsere Aufgabe, festzustellen, ob eine derartige Unterscheidung auch nach der Untersuchung einer größeren Anzahl von Stämmen aufrecht zu halten ist; und das war nicht der Fall. Von den vier Cholerastämmen konnte sich keiner dauernd im Milchsäure-Ammoniaknährboden vermehren; zwei davon zeigten gelegentlich nach der ersten Beimpfung vom Nähragar geringe Vermehrung, doch ließen sich Passagen nicht gewinnen. Einer und zwar der in den früheren Versuchen benützte Stamm zeigte manchmal gar keine Vermehrung, manchmal wuchs er im Milchsäure-Ammoniaknähr-

[1]) *Voges*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **15**. 1894.
[2]) *Kisch*, l. c.

boden zunächst kräftig heran, führte auch in der zweiten Passage noch zu einer Trübung, stellte aber regelmäßig in der dritten oder vierten sein Wachstum ein. Ein letzter Stamm war überhaupt nicht zum Anwachsen zu bringen. Und ebensowenig vermochten die beiden Kulturen des Vibrio *Metschnikoff* unter diesen Verhältnissen zu gedeihen. Ganz die gleichen Beobachtungen konnten wir mit drei Cholera- und zwei Metschnikoff-Kulturen machen, wenn wir, wie es in einem Versuche geschah, im Milchsäure-Ammoniaknährboden die Milchsäure durch Äpfelsäure oder Citronensäure oder Glycerin ersetzten. Wenn es auch gelegentlich zu anfänglicher Vermehrung kam, ließen sich doch nie mehrere Passagen erzielen. Auch das Nitrat konnten vier geprüfte Cholerastämme im Milchsäure-Nitratnährboden nicht als einzige Stickstoffquelle verwerten. Im Asparaginsäure- und im Leucin-Milchsäurenährboden sind in einem Versuche drei Cholerastämme nicht gewachsen. Aber eine darin geprüfte Kultur des Vibrio *Metschnikoff* konnte sich in Passagen vermehren.

Wir erwähnen diese Beobachtung aus einem besonderen Grund. Nach den Erfahrungen an den übrigen untersuchten Bakterienarten sind wir zu der Annahme gekommen, daß die Verwertung dieser beiden Aminosäuren ihrem Wesen nach eine Ammoniakassimilation ist, denn nur ammoniakassimilierende Stämme haben ihren Stickstoffbedarf aus diesen Aminosäuren decken können, und die Ausnützbarkeit der Aminosäuren durch die einzelnen Bakterienarten zeigte deutliche Beziehungen zur Verwertung der entsprechenden organischen Säuren ohne die Aminogruppe. Der Vibrio *Metschnikoff* konnte aber in ammoniakhaltigen Nährböden nicht wachsen, dagegen mit diesen beiden Aminosäuren, wenn Milchsäure verfügbar war. Zunächst war zu bedenken, daß hier ja zwei Kohlenstoffquellen, die Milchsäure und die Kohlenstoffkette der Aminosäure vorhanden sind, während im Milchsäure-Ammoniaknährboden nur eine Kohlenstoffverbindung vorhanden ist. Wir versuchten also, denselben Stamm in einem Milchsäure-Ammoniaknährboden, dem als zweite gut ausnützbare Energiequelle 0,3% Traubenzucker zugesetzt war, zum Wachstum zu bringen. Dies gelang aber nicht. Dadurch schien also unsere Auffassung, daß auch bei der Verwertung der oben genannten Aminosäuren eine Ammoniakassimilation statthat, widerlegt zu sein. Wenn man aber diese im aminosäurehaltigen Nährboden aufgewachsenen Keime in einen Milchsäure-Ammoniaknährboden mit 0,3% Traubenzucker übertrug, so konnten sie sich jetzt darin vermehren, während sie nach der Beimpfung von Nähragar darin nicht wuchsen. Im Milchsäure-Ammoniaknährboden ohne Traubenzucker vermochten aber auch diese aus dem aminosäurehaltigen Nährboden übertragenen Keime nicht zu wachsen. Es gibt also unter den Keimen dieses Vibrio *Metschnikoff* auch solche, welche unter besonderen Bedingungen zur Ammoniakassimilation befähigt sind. Noch ausgesprochener, wie wir das

schon bei den Shiga-Kruse- und Kolitisbacillen beobachten konnten, sehen wir hier, daß das Vermögen der Ammoniakassimilation, wenn es in geringem Maße ausgebildet ist, nur dort in die Erscheinung tritt, wo die sonstigen Ernährungsverhältnisse besonders günstig sind. Und das ist hier in den aminosäurehaltigen Nährböden der Fall. Dort reichern sich die wenigen zur Ammoniakassimilation befähigten Keime an, so daß diese ausgewählten Individuen jetzt auch unter ungünstigeren Verhältnissen nach Übertragung in andere ammoniakhaltige Nährböden zu wachsen vermögen. Dabei zeigt sich, wie verschieden die Ansprüche der Bakterien sind, um die Ammoniakassimilation vollbringen zu können.

Bei zwei Cholerastämmen haben wir nach der bei anderen Bakterienarten erprobten Methode versucht, aus ihnen ammoniakassimilierende Kulturen zu gewinnen, doch ist uns die Anreicherung solcher zur Ammoniakassimilation befähigten Keime nicht geglückt. Woran es liegt, daß einer unserer Cholerastämme in früheren Versuchen im Milchsäure-Ammoniaknährboden wuchs, später dagegen nicht mehr, haben wir experimentell nicht aufklären können. Möglich ist, daß es unter den Cholerastämmen, so wie dies ja auch *Kisch* mitteilt, ammoniakassimilierende gibt und auch die Cholerabacillen in dieser Beziehung verschiedene Fähigkeit zeigen können. Aus solchen ammoniakassimilierenden Kulturen könnten, wie uns die eigenen und die von *van Loghem* mitgeteilten Erfahrungen an Typhusbacillen lehren, gelegentlich ammoniaknichtassimilierende Stämme entstehen.

Proteusbacillen.

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei Proteusbacillen. Von diesen haben wir 9 Stämme untersucht, darunter den X_2- und den X_{19}-Bacillus (*Weil* und *Felix*). Schon in den früher mitgeteilten Versuchen mußten wir das schlechte und langsame Wachstum im Milchsäure-Ammoniaknährboden und das Ausbleiben der Vermehrung in der dritten oder vierten Passage betonen; nach Zusatz von Sulfat waren uns aber zahlreiche Passagen gelungen. Bei den jetzigen ausgedehnteren Versuchen haben wir andere Erfahrungen als bei den früheren, orientierenden Versuchen gemacht.

Alle neun Stämme verhielten sich gleich. Sie sind nach der Einsaat vom Nähragar im Milchsäure-Ammoniaknährboden bei einigen Versuchen gar nicht angewachsen, bei anderen haben sie sich zunächst recht kräftig vermehrt, so daß eine ziemlich dichte Trübung auftrat; mehr wie drei Passagen sind uns aber nicht gelungen, meistens fehlte das Wachstum schon in der zweiten. Auch nach Zusatz von 0,005% Magnesiumsulfat und Spuren von Calciumchlorid und Eisensulfat waren sie darin nicht weiter züchtbar. Das bei allen Stämmen beobachtete schwankende Verhalten in der anfänglichen Vermehrung bei mehr-

maligen, unter gleichen Bedingungen vorgenommenen Versuchen ließ uns in Analogie zu den Verhältnissen bei Typhus- und Shiga-Kruse-Bacillen daran denken, daß auch hier die einzelnen Keime desselben Stammes verschiedene Fähigkeiten aufweisen und einmal mehr, einmal weniger von Keimen bestimmter Befähigung in die Nährböden eingeimpft worden war. Aber auch nach massiger Einsaat, wobei also auch solche in geringer Zahl vorhandene Keime sich hätten bemerkbar machen müssen, haben wir keine dauernd im Milchsäure-Ammoniaknährboden wachsende Kultur gewinnen können. Stach man zehn isolierte Kolonien von einer Endoagarplatte eines solchen Stammes ab, so zeigte jede von diesen Kulturen das einmal auftretende, einmal fehlende anfängliche Anwachsen im Milchsäure-Ammoniaknährboden, wobei manchmal ein, zwei oder drei Passagen gelangen, ohne daß jedoch die Keime in diesem Nährboden beliebig fortzüchtbar waren. Diese Beobachtungen und den Widerspruch mit früher mitgeteilten Versuchen möchten wir bei diesen mit starken tryptischen Fermenten ausgestatteten Keimen folgendermaßen erklären: Die Proteusbacillen können sich nach der Übertragung von Nähragar, wie dies bei allen Bakterienarten vorkommen kann, im einfachen Nährboden ein wenig auf Kosten der mitübertragenen geringen Nährstoffmengen vermehren, sich dann dank ihrer Fermente durch Verdauung der abgestorbenen Bakterien Nährmaterial verschaffen, so daß also ihre Vermehrung bei weiterer Bebrütung immer mehr zunimmt; es brauchen also nicht allein die als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle in den einfachen Nährboden eingebrachten bekannten Stoffe zu sein, welche hier das Wachstum bedingen. Da nun bei diesen Bakterien, um Passagen zu gewinnen, 6—8 Ösen in die neu zu beimpfenden 4 ccm Flüssigkeit übertragen werden mußten, so konnte es vorkommen, daß dabei so viel abgebaute Leibesbestandteile mit den Bakterien in die neu beimpfte Passage übertragen wurden, daß es wiederum zu einem geringen Wachstum kam. Wir müssen also gerade bei diesen, ein Eiweißferment produzierenden Bakterien in der Deutung der Beobachtungen ganz besonders vorsichtig sein und aus dem Auftreten ganz geringen, wenn auch in Passagen fortführbaren Wachstums, nicht, wie wir das früher, als unsere Erfahrungen noch viel geringer waren, taten, darauf schließen, daß es hier *nur* die dem Nährboden in bekannten Mengen zugesetzten Nährstoffe sind, die dieses geringe Wachstum unterhalten.

Ist die Bernstein-, Äpfel-, oder Citronensäure die Kohlenstoff- und Ammoniak die Stickstoffquelle, so waren mit diesen Proteusstämmen die gleichen Beobachtungen wie im Milchsäure-Ammoniaknährboden zu machen. Auch im Milchsäure-Nitratnährboden trat keine dauernde Vermehrung auf. Im Alanin-Milchsäure-, besonders aber im Leucin-Milchsäurenährboden wurde das Wachstum nach der Beimpfung vom

Nähragar sehr üppig, so daß eine dichte Trübung der Nährflüssigkeit entstand, und doch sind auch hier keine Passagen gelungen. *Wir halten uns also nach den eben besprochenen Versuchen nicht mehr für berechtigt, den Proteusbakterien unter den beschriebenen Ernährungsverhältnissen die Fähigkeit der Ammoniakassimilation zuzusprechen.*

Vom **Bacillus faecalis alcaligenes** haben wir weitere fünf Stämme geprüft, und es stellte sich heraus, daß einer von ihnen und die zwei früher geprüften im Milchsäure-Ammoniaknährboden wuchsen, die vier anderen dagegen nicht. Wir haben also jetzt auch hier festzustellen, daß es, wie bei Typhus-, Paratyphus A- und Shiga-Kruse-Bacillen ammoniakassimilierende und ammoniaknichtassimilierende Stämme gibt.

Und schließlich kommen wir auf den **Bacillus pyocyaneus** zu sprechen. Seine Ernährungsbedürfnisse haben wir in unserer früheren Veröffentlichung im Gegensatz zu den zuletzt besprochenen vier Bakterienarten ausführlich dargestellt, so daß wir dies hier nicht wiederholen. Wir haben nur einen Stamm untersucht. Er diente uns als Beispiel eines ganz besonders anspruchslosen Bacteriums von erstaunlich weitreichenden und verschiedenartigen Fähigkeiten. Mit der Befähigung, so komplizierte Körper wie das Eiweiß durch seine Fermente anzugreifen, vereint er die weitgehendsten synthetischen Leistungen aus den einfachsten Verbindungen. Auch in vielen in dieser Arbeit benützten Nährböden zeigte er diese Vielseitigkeit. Er ist in der Stickstoffassimilation allen anderen bisher besprochenen Bakterienarten überlegen, denn er kann sehr gut sowohl aus Ammoniak wie aus Nitrat seinen Stickstoffbedarf unter den Bedingungen dieser einfachen Nährböden decken. Außerdem aber vermag er auch sehr einfache Substanzen als Kohlenstoff- und Energiequelle zu benützen. So zeigte er im Gegensatz zu den anderen besprochenen Arten im Ameisensäure-Ammoniaknährboden noch eine, wenn auch kümmerliche Vermehrung, er konnte sogar in einem Carbonat-Ammoniaknährboden etwas wachsen. Wir wollen es nicht unterlassen, bezüglich dieser letzten Beobachtung unsere in der Deutung der Tatsache allmählich gewonnenen Erfahrungen anzuwenden. Die Zusammensetzung des Ameisensäure-Ammoniaknährbodens ist oben[1]) angegeben, die des Carbonat-Ammoniaknährbodens war: 0,5% Kochsalz, 0,2% Kaliumbiphosphat, 0,5% Ammoniumsulfat und 0,42% Natriumcarbonat oder 0,5% Kochsalz, 0,2% Kaliumbiphosphat und 0,6% Ammoniumcarbonat. Im Ameisensäure-Ammoniaknährboden wächst unser Pyocyaneus sehr langsam, aber zu deutlicher Trübung und unter gelegentlicher Farbstoffbildung heran. Mit steigender Passagenzahl wird das Wachstum etwas schneller. Im Carbonat-Ammoniaknährboden ist die Vermehrung nur *sehr gering*. Sie führt nach etwa einer Woche nur zur Opalescenz des Nährbodens, doch ist sie in Passagen

[1]) Siehe I. Mitteilung in dieser Zeitschrift. I. Teil c).

fortführbar. Wir haben früher diese immer wieder gemachte Beobachtung dahin gedeutet, daß sich der Pyocyaneus allein aus Carbonat und Ammoniak, wenn auch äußerst dürftig, vermehren kann. Es handelt sich auch hier, wie bei Proteus- und auch bei Cholerabacillen, um ein mit starken tryptischen Fermenten versehenes Bacterium; deshalb möchten wir nach den Erfahrungen mit diesen Bakterien wegen der auch hier notwendigen reichlichen Beimpfung einer Passage aus der anderen die Möglichkeit offen lassen, daß außer dem Carbonat und Ammoniak noch die jedesmal mitübertragenen Stoffwechselprodukte und abgebauten Leibesbestandteile toter Bakterien für dieses zwar in Passagen fortführbare, aber immer nur sehr dürftige Wachstum in Betracht kommen; denn wir konnten nachweisen, daß auch unter den Verhältnissen dieser einfachen Nährböden, z. B. des Milchsäure-Ammoniak- und Ameisensäure-Ammoniaknährbodens Ferment gebildet wird. Nach Abtötung solcher Kulturen durch Äther und Abzentrifugieren der Bakterienleiber verflüssigte diese sterile Flüssigkeit die Gelatine.

V. Teil.

Die Ernährungsbedürfnisse des Colibacillus.

Wir haben schließlich als letzten den Colibacillus in seinen Ernährungsbedürfnissen systematisch untersucht. Denn seine bekannten ernährungsphysiologischen Beziehungen zu den pathogenen Paratyphus-, Typhus- und Ruhrbakterien ließen einen Vergleich ihrer Fähigkeiten mit denen des Colibacillus nicht unwichtig erscheinen. Fanden wir unter diesen pathogenen Keimen in der verschiedenen Befähigung der einzelnen Stämme und Keime etwas komplizierte Verhältnisse, so sind diese bei den Colibacillen viel einfacher.

Es wurden sechs typische, indolbildende Colistämme untersucht; drei davon prüften wir in jedem der weiter unten besprochenen Nährböden; zeigten sich dabei in einem Nährboden Unterschiede gegenüber dem Paratyphus B-Bacillus, so wurden auch die drei anderen Stämme zur Untersuchung herangezogen.

Im Ameisensäure-Ammoniaknährboden fehlte jede Vermehrung der Colibacillen. Dagegen vermochten sie im Essigsäure-Ammoniaknährboden ähnlich wie die Paratyphus B-Bakterien und im Gegensatz zu den Typhus- und Shiga-Kruse-Bacillen in Passagen zu wachsen. Es dauerte zwar mehrere Tage, gelegentlich sogar eine Woche, bis es darin zu sichtbarer Vermehrung kam, doch führte diese zu einer kräftigen Trübung des Nährbodens. Im Oxalsäure-Ammoniaknährboden war ebenfalls ein Wachstum zu beobachten. Doch traf dies einmal nicht für alle Stämme zu, dann aber kam es dabei nur zu einer Opalescenz des Nährbodens. Passagen waren schwer zu erzielen und nur bei jedesmaliger Übertragung von 6—8 Ösen. Wir möchten deshalb entsprechend den

bei den Ausführungen über die Methodik dargelegten Überlegungen nicht als gesichert hinstellen, ob hier wirklich allein die Oxalsäure und das Ammoniak benützt werden, sondern wir müssen bei dieser schwachen Vermehrung und bei der zur Gewinnung von Passagen notwendigen reichlichen Einsaat von einem Kölbchen in das andere damit rechnen, daß dabei möglicherweise die jedesmal mitübertragenen Stoffwechselprodukte der Keime die geringe Vermehrung mit veranlassen können. Im Milchsäure-Ammoniaknährboden dagegen wuchsen alle sechs Colistämme gut und schnell, allerdings meist nicht so üppig, wie die Paratyphus B-Bacillen. Es ist auffällig, wie sich gerade dieser Nährboden im Gegensatz zu anderen ähnlichen Nährlösungen dadurch auszeichnet, daß fast alle ammoniakassimilierenden Stämme jeder untersuchten Bakterienart darin zu wachsen vermochten. Im Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden vermehrten sich die Colistämme. Wir erinnern daran, daß sich gerade dadurch die Paratyphus B-Stämme von den ammoniakassimilierenden Typhus-, Paratyphus A- und Shiga-Stämmen unterschieden haben, daß sie in diesem Nährboden gediehen. Die Äpfelsäure, die ja für alle untersuchten Bakterienarten besser verwertbar als die Bernsteinsäure war, ist auch für die Colibacillen, wie für die Paratyphus B-Bacillen ein guter Nährstoff, so daß sie sich im Äpfelsäure-Ammoniaknährboden rasch und üppig vermehren konnten. Was das Wachstum im Weinsäure-Ammoniaknährboden betrifft, so liegen hier die Verhältnisse gerade wie beim Paratyphus B-Bacillus, und wir befinden uns in demselben Widerspruch zu *Pesch*[1]), wie wir das bereits dort besprochen haben. Die Vermehrung der Colibacillen war minimal und es gelangen uns überhaupt keine Passagen, weder mit 0,5% noch mit 1% weinsaurem Natrium, noch mit 0,54% weinsaurem Kalium, während *Pesch* seinen allerdings agarhaltigen Nährboden als Beispiel besonders guten Wachstums der Colibacillen und übereinstimmenden Verhaltens mit Paratyphus B-Bacillen benützt. Im Citronensäure-Ammoniaknährboden zeigten die Colibacillen ein auffälliges Verhalten; hier stimmen unsere Versuche im wesentlichen mit denen von *Pesch* überein, der auf diese Besonderheit der Colibacillen aufmerksam gemacht hat. [Siehe auch *C. Wagner*[2])]. Auch unter den von uns gewählten einfachen Ernährungsbedingungen konnten die meisten Colistämme die Citronensäure nicht als Kohlenstoffquelle benützen, während diese Verbindung den Paratyphus B-Bacillen ganz besonders gutes Wachstum erlaubt. Drei Colistämme waren darin überhaupt nicht zur Vermehrung zu bringen, einer bewirkte eine ganz geringfügige allmählich auftretende Trübung des Nährbodens, war aber nicht darin fortzüchtbar, zwei andere vermehrten sich zwar äußerst langsam, aber schließlich doch in beträchtlichem

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **86**. 1921.
[2]) Zeitschrift f. Hyg. u. Infektionskrh., Bd. **90**.

Maße, und ließen sich in vielen Passagen weiterzüchten, wobei allmählich das Wachstum schneller und kräftiger wurde; allerdings gelang es nicht bei jedem Versuch, diese Stämme zum Anwachsen zu bringen. Auch auf einem festen agarhaltigen Nährboden von der durch *Pesch* angegebenen Zusammensetzung wuchsen die meisten Stämme in 3—8 Tagen in feinsten, nur mit der Lupe sichtbaren Kolonien, wie sie nach gleichlanger Bebrütung auf demselben Nährboden ohne Zusatz irgendeiner Kohlenstoffquelle ebenfalls zu sehen waren; die beiden in flüssigem Citronensäure-Ammoniaknährboden wachsenden Stämme aber zeigten auf ebensolchem agarhaltigem Nährboden schon nach wenigen Tagen einen ohne Lupe sichtbaren feinen Rasen, von welchem aus sich besonders leicht Passagen in flüssigem Nährboden gleicher Zusammensetzung gewinnen ließen. Doch lagen die Verhältnisse hier offensichtlich anders als bei den ammoniakassimilierenden Typhusbacillen, bei denen ja in allen untersuchten Stämmen nur einzelne Keime zur Verwertung von Citronensäure und Ammoniak befähigt waren und dementsprechend nur einzelne isolierte große Kolonien auf dem dicht beimpften Citronensäure-Ammoniak-Agarnährboden auftraten, während hier bei den Citronensäure verwertenden Colistämmen die ganze Oberfläche des Schrägröhrchens gleichmäßig mit feinen Kolonien besetzt war.

Eine Entwicklungshemmung durch Citronensäure liegt bei den in diesem Nährboden nicht wachsenden Stämmen nicht vor, sondern die Vermehrung bleibt aus, weil die Colibacillen die Citronensäure nicht angreifen können. Denn fügte man dem Citronensäure-Ammoniaknährboden 0,05% Traubenzucker zu, so trat schnelles Wachstum auf. Dieses wurde trotz der geringen Traubenzuckermengen nach 2 Tagen schon so üppig, daß man sich fragen mußte, ob vielleicht bei Gegenwart einer zweiten als Energiequelle dienenden Kohlenstoffverbindung die Citronensäure doch angegriffen wird und nur dann unverwertbar ist, wenn sie die einzige Kohlenstoff- und Energiequelle darstellt. Wir haben aber dafür keinen Anhaltspunkt gewinnen können, denn derselbe Nährboden mit 0,05% Traubenzucker erlaubte auch ohne Citronensäure ein gleich schnelles Wachstum der Colibacillen, als wenn sie zugegen war. Es besteht also die Beobachtung von *Pesch* insoweit zu Recht, daß ein Teil der Colistämme in einem Citronensäure-Ammoniaknährboden nicht zu gedeihen vermag; doch gibt es auch solche mit geringem, aber dauerndem Wachstum. Durch diese Eigentümlichkeit unterscheidet sich der Colibacillus von Paratyphus B- und den ammoniakassimilierenden Typhusstämmen. Die Citronensäure ihrerseits erhält gegenüber der Milch-, Bernstein- und Äpfelsäure eine Sonderstellung, ähnlich wie wir dies bei den Shiga-Kruse-Stämmen sahen. Und die gleiche Besonderheit, die für den Colibacillus der Citronensäure zukommt, besitzt die Bernsteinsäure für die Typhusbacillen. Die Notwendigkeit erhöhter Sauer-

stoffzufuhr weist darauf hin, daß Oxydation beim Stoffwechsel in diesen Nährböden eine besondere Rolle spielten. Doch handelt es sich offensichtlich bei Assimilation dieser verschiedenen organischen Säuren nicht allein um Oxydationen, sondern um komplizierte Vorgänge, die von einer Bakterienart vollzogen werden können, von einer anderen aber nicht.

Im Glycerin-Ammoniaknährboden sind die geprüften Colistämme ebenso gut wie die Paratyphus B-Bazillen gewachsen, auch hier gelangen trotz der starken Säurebildung die Passagen. Und schließlich war das Verhalten gegenüber Arabinose von Interesse, da in dieser Beziehung die Paratyphus B-Bacillen allein den Typhus-, Paratyphus A- und Shiga-Kruse-Bacillen gegenüberstehen. Es stellte sich heraus, daß auch die Colibacillen im Arabinose-Ammoniaknährboden wie die Paratyphus B-Bakterien schnell und üppig und unter Säurebildung wuchsen.

Das Nitrat als einzige Stickstoffquelle konnte von den meisten Colistämmen nicht assimiliert werden; sie zeigten wohl im Milchsäure-Nitratnährboden gelegentlich in den ersten zwei Passagen eine ganz unbedeutende Vermehrung, waren aber nicht weiter fortzüchtbar. Nur ein Stamm zeigte ein langsames, in Passagen fortführbares Wachstum. Auch hierin ist also das Verhalten der Colibacillen dem der Paratyphus B-Bakterien durchaus ähnlich. Wurde die Milchsäure in diesem Nährboden durch Traubenzucker oder Glycerin ersetzt, so führte auch dies nicht zu dauernder Vermehrung der Colistämme. Im Citronensäure-Nitratnährboden trat natürlich erst recht kein Wachstum auf. Es ist dies wegen der später zu besprechenden Versuche mit Paracolibacillen wichtig.

Bei der Verwertung der Aminosäuren zeigten sich ebenfalls keine wesentlichen Verschiedenheiten zwischen Coli- und Paratyphus B-Bakterien. Mit 0,5% Glykokoll oder 0,1% Tyrosin als einzig verfügbarer Stickstoff- und Kohlenstoffquelle konnten unsere Stämme nicht gedeihen. Mit Leucin trat ein sehr schwaches Wachstum in Passagen auf. Die Versuche wurden mit dem Leucinpräparat angestellt, mit dem auch die meisten Paratyphus B-Stämme ohne Milchsäurezusatz wuchsen (vgl. S. 255). Sobald 0,5% Natriumlactat als zweite Energiequelle hinzutrat, wurden diese drei Aminosäuren gut ausgenützt. Mit 0,5% Alanin und 0,5% Asparaginsäure wurde auch ohne Milchsäure gutes Wachstum beobachtet. Mit Tryptophan wuchs der Colibacillus aber schlechter als mit der gleichen Menge Alanin und nicht besser als die Paratyphus B-Bacillen, trotzdem er als Indolbildner das Indolalanin weitgehender spalten kann. Erst nach Milchsäurezusatz kam es im Tryptophannährboden zu kräftigem Wachstum. Unterschiede in der Stärke der Vermehrung waren auch beim Colibacillus unter den verschiedenen uns zur Verfügung stehenden Tryptophanpräparaten zu bemerken.

Tabelle VII.

Die Verwertung verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen durch Colibacillen.

Kohlenstoffquelle	Ameisensäure	Essigsäure	Oxalsäure	Milchsäure	Bernsteinsäure	Äpfelsäure	Weinsäure	Citronensäure	Glycerin	Arabinose	Milchsäure	Glykokoll	Milchsäure	Alanin	Asparaginsäure	Leucin	Milchsäure	Milchsäure
Stickstoffquelle	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Nitrat		Glykokoll				Leucin	Harnstoff
Stamm 1	0		0	+	+	+	0	?	+	+	0							
Stamm 2	0	+	+ ?	+	+	+	0	+ 0	+	+	+	0	+	+	+	+ ?	+	+
Stamm 3	0	+	+ ?	+	+	+	0	0 +	+	+	0		+	+	+	+ ?	+	+
Stamm 4	0	+		+				0			0	0	+	+	+		+	+

Zeichenerklärung wie Tabelle IV.

Schließlich konnte der Colibacillus im Harnstoff-Milchsäurenährboden wie die Paratyphus B-Bacillen und die meisten ammoniakassimilierenden Typhusstämme kräftig gedeihen. Auch diese Feststellung verdient in Rücksicht auf das Verhalten mancher Paracolibacillen Beachtung.

Die folgende Tabelle VII gibt einen Überblick über die wichtigsten, eben besprochenen Resultate; sie enthält eine Auswahl der untersuchten Stämme.

Mit den **Paracolibacillen** haben wir nur Versuche gemacht, um zu prüfen, ob sie in ihren prinzipiellen ernährungsphysiologischen Eigenschaften mit dem Colibacillus übereinstimmen. Bekanntlich stellen sie ja keine einheitliche Bakterienart, sondern eine Gruppe verschiedener Mikroorganismen dar; gemeinsam ist ihnen, daß sie als gramnegative, zum Teil bewegliche Stäbchen aus Traubenzucker reichlich, aus Milchzucker kein Gas bilden, Milch nicht koagulieren, Gelatine und Löffler-Serum nicht verflüssigen; Indolbildung, Verhalten in Lackmusmolke, Spaltung von Mannit, Maltose und Saccharose schwanken. Es war nicht unsere Absicht, systematisch die Ernährungsbedürfnisse dieser nicht einheitlichen, unter dem Namen der Paracolibacillen zusammengefaßten Bakterien zu untersuchen, sondern wir wollten uns nur davon überzeugen, ob sie in den in unseren künstlichen Nährböden für Colibacillen charakteristischen Eigenschaften mit diesen übereinstimmen. Wir haben deshalb sechs untereinander verschiedene Paracolistämme ausgewählt, von denen drei Indol bildeten, die drei anderen nicht, die aber auch sonst untereinander verschieden waren. Die kleine Tabelle VIII gibt über ihr Verhalten in den gebräuchlichen Laboratoriumsnährböden Auskunft.

Tabelle VIII.

Das Verhalten verschiedener Paracolistämme in einigen einfachen, künstlichen Nährböden.

	Geprüft in den gebräuchlichen Nährböden							Wachstum im		
	Milchzucker-spaltung	*Indol*-bildung in Trypsinbouillon	Verhalten in *Lackmusmolke* Säurebildung	Verhalten in *Lackmusmolke* Alkalibildung	Spaltung von *Mannit*	Spaltung von *Maltose*	Spaltung von *Saccharose*	*Citronensäure*-Ammoniak-Nährboden	Milchsäure-*Nitrat*-Nährboden	*Harnstoff*-Milchsäure-Nährboden
Paracolibacill. Stamm 1	0	+		+	0	0	0	0	0	0
Paracolibacill. Stamm 2	0	+	+		+	+	0	0	0	+
Paracolibacill. Stamm 3	0	+		+	0	0	0	+	0	0
Paracolibacill. Stamm 4	0	0		+	+	+	0	+	+	+
Paracolibacill. Stamm 5	0	0		+	+	+	+	+	+	+
Paracolibacill. Stamm 6	0	0	+		+	+	+	+	+	+

Auch in den einfachen künstlichen Nährböden zeigten diese Stämme untereinander bedeutende Verschiedenheit. Alle sechs wuchsen sehr gut im Milchsäure-Ammoniaknährboden, waren also imstande, Ammoniak zu assimilieren. Unsere Untersuchungen bezogen sich nun auf die Verwertung der Citronensäure, des Nitrats und des Harnstoffes unter denselben Bedingungen, wie dies für die Colibacillen geprüft worden ist. Wie ebenfalls aus der Tabelle VIII hervorgeht, wuchsen einige von ihnen (Stamm 3, 4, 5, 6) im Citronensäure-Ammoniaknährboden; sie konnten sich darin sehr schnell und üppig vermehren und waren darin also von den Colibacillen verschieden, von denen ja die meisten Stämme gar nicht, andere nur sehr langsam und sehr dürftig gedeihen konnten. Auch zur Nitratassimilation sind einige dieser Paracolistämme (Stamm 4, 5, 6) befähigt. Sie waren im Milchsäure-Nitratnährboden in Passagen züchtbar, während die Colibacillen darin meist überhaupt kein, selten nur ein ganz schwaches Wachstum zeigten. Da dies gerade die citronensäureverwertenden Paracolistämme waren, so wuchsen sie auch im Citronensäure-Nitratnährboden, in dem wir keinen Colistamm zum Wachstum bringen konnten. Und schließlich fehlte *manchen* Paracolistämmen (Stamm 1 und 3) die Fähigkeit, den Harnstoff unter den Verhältnissen dieser einfachen Nährböden zu spalten und als Stickstoffquelle zu benutzen, denn sie vermochten im Harnstoff-Milchsäurenährboden im Gegensatz zu den Colibacillen nicht zu wachsen. Wir konnten nicht beobachten, daß irgend welche der in diesen Versuchen geprüften Eigenschaften miteinander verknüpft sind: die indolnegativen Stämme (4, 5, 6) konnten zwar alle drei Citronensäure angreifen, aber auch ein indolpositiver Stamm (3); unter den indolpositiven gibt es harnstoffspaltende und nichtspaltende Stämme; betrachten wir die Nitratassimilation, so haben die drei in der Tabelle enthaltenen, kein Indol bildenden Stämme (4, 5, 6) sämtlich im Milchsäure- und auch im

Citronensäure-Nitratnährboden wachsen können. Da zwei von diesen (Stamm 4, 5) außerdem die Lackmusmolke bläuten und Milchzucker nicht vergären konnten, so ähnelten sie den Paratyphus B-Bacillen sehr, besonders Stamm 4, der auch Saccharose nicht angreifen konnte, war in den gebräuchlichen Nährböden dem Paratyphus B-Bacillus kulturell sehr ähnlich. In den künstlichen Nährböden unterschied er sich von ihm durch die gute Nitratassimilation. Wir hofften also darin ein Unterscheidungsmerkmal für die Paratyphus B-Bacillen und das Paracoli anindolicum zu finden; doch hat sich an mehreren daraufhin untersuchten Stämmen, die in die Tabelle nicht aufgenommen sind, gezeigt, daß die Nitratverwertung auch bei diesen nichtindolbildenden, die Lackmusmolke bläuenden Paracolistämmen nicht konstant ist.

Es zeigt sich also auch an den im einfachen künstlichen Nährboden beobachtbaren Fähigkeiten, wie verschieden die unter der Bezeichnung Paracolibacillen zusammengefaßten Stämme sind. Die uns hier interessierende Frage nach der Stellung der Paracoli- zu den Colibacillen ist dahin zu beantworten, daß es unter den Paracolibacillen Stämme gibt, welche dem Bacterium coli auch hinsichtlich der in den einfachen Nährböden für diese charakteristischen Merkmale sehr nahestehen, daß dagegen *andere Paracolistämme in ihren ernährungsphysiologischen Eigenschaften vom Colibacillus verschieden sind.*

VI. Teil.

Ist eine Ammoniakassimilation auch unter Sauerstoffabschluß möglich?

Die Befähigung zur Ammoniakassimilation ist, wie die voranstehenden Versuche zeigen, einer ganzen Reihe von Bakterienarten eigen. Bei Paratyphus B- und Colibacillen waren alle Stämme dazu imstande. Bei Typhus-, Paratyphus A- und Shiga-Kruse-Bacillen nur ein Teil, andere dagegen nicht. Diese Differenz unter den Stämmen gleicher Art geht auf die unterschiedliche Befähigung der einzelnen Individuen zurück. Wir vergegenwärtigen uns die Resultate bei den verschiedenen untersuchten Arten und Stämmen; dabei sehen wir, daß die *Bedingungen*, unter welchen das Vermögen, Ammoniak zu assimilieren, durch die Vermehrung der Keime beobachtbar wird, recht verschieden sind. So gelang z. B. die Ammoniakassimilation den Paratyphus B-Bacillen unter fast allen bis jetzt besprochenen Bedingungen; dann aber beobachteten wir Bakterien, die sich aus Ammoniak nur dann aufbauen konnten, wenn zwei Energiequellen, Milchsäure und Traubenzucker, gleichzeitig zur Verfügung standen, das waren auf ganz bestimmtem Weg angereicherte Keime des Vibrio Metschnikoff. Es sind also wohl verschiedene energetische Bedürfnisse der einzelnen Bakterienstämme, die hier eine Rolle spielen mögen. Es soll jetzt die Frage untersucht werden, ob eine

Ammoniakassimilation auch unter der Bedingung des Sauerstoffausschlusses möglich ist.

Da uns ammoniakassimilierende Stämme verschiedener Arten zur Verfügung stehen, so konnte die Untersuchung mit einigen davon, und zwar mit Typhus-, Shiga-Kruse-Bacillen, Paratyphus B- und Colibacillen durchgeführt werden, um zu prüfen, ob sich darin die einzelnen Arten unterscheiden oder ob hier eine grundsätzliche Übereinstimmung besteht.

Da wir gerade bei diesen Versuchen mit bedeutenden technischen Schwierigkeiten zu kämpfen hatten, müssen wir bei der prinzipiellen Bedeutung, die diese Frage hat, auf die Methodik und einige zur Auffindung von Fehlerquellen angestellte Experimente etwas näher eingehen.

Versuchstechnik.

Die Apparaturen zur Züchtung der Bakterien in einer Wasserstoffatmosphäre sind für feste Nährböden eingerichtet und für flüssige Nährsubstrate nicht brauchbar. Versuche in flüssigen Nährböden waren aber notwendig, da nur dort der Grundsatz bekannter und konstanter Nährbodenzusammensetzung, soweit wie möglich, verwirklicht ist. Wir haben diese Versuche in langhalsigen Kölbchen (nach *Burri*) angestellt, in deren Hals eine mit Pyrogallol und Kalilauge getränkte Watte steckte und die nach außen durch Gummistopfen und Paraffinierung abgeschlossen waren. Da wir uns bewußt waren, daß hierdurch nicht in jedem Falle eine Garantie für anaerobe Verhältnisse gegeben ist, und wir dementsprechend unregelmäßige Versuchsergebnisse bekamen, so haben wir bei dieser Versuchsanordnung nur das Ausbleiben der Vermehrung als sicher verwertbares Resultat betrachtet. Als beweisend galten deshalb nur solche Versuche, bei denen nach Entfernung des Sauerstoffs das Wachstum ausblieb, nach Abnahme des Verschlusses aber unter Sauerstoffzutritt alsbald ohne nochmalige Beimpfung in derselben Nährlösung Vermehrung einsetzte. Diese Schwierigkeiten haben uns für die Beobachtung anaeroben Wachstums den agarhaltigen Nährböden zugeführt, doch hielten wir an dem Grundsatz fest, kein Resultat ohne ein gleiches Ergebnis in flüssigem Nährboden als feststehend zu betrachten.

Wir versuchten den Agar zu reinigen. Das einfachste war, den Stangenagar mit destilliertem Wasser zu extrahieren und so nach Möglichkeit von den in ihm enthaltenen Beimengungen zu befreien. Durch zu langes Wässern und Einhaltung höherer Temperaturen, z. B. 60°, kann seine Erstarrungsfähigkeit leiden. Setzt man dem Waschwasser geringe Mengen Salzsäure zu, so wird der Agar nach dem Kochen nicht mehr fest, auch nicht, wenn er nachträglich neutralisiert wird. Wir haben versucht, den Agar aus wässeriger Lösung mit Alkohol zu fällen und so vielleicht ein reines Präparat zu bekommen. Es entsteht dabei ein dichter, weißer Niederschlag, der bei 5proz. Agarlösung am stärksten ist, wenn die doppelte Menge 95proz. Alkohols zur einfachen Menge verflüssigten Agars gegossen wird. Läßt man den Niederschlag absitzen oder zentrifugiert ihn ab und löst ihn wieder in kochendem Wasser, so zeigt sich, daß er seine Erstarrungsfähigkeit behalten hat, doch stellte es sich heraus, daß auch auf diese Weise keine bessere Reinigung zustande kommt, als wenn man den Stangenagar 2—3 Tage lang bei Zimmertemperatur in möglichst oft gewechseltem, destilliertem Wasser extrahiert. Wir sind also auf die einfachste Methode zurückgekommen und haben damit zwar oft Mißerfolg erlebt, meist brauchbaren, aber nur selten einwandfreien Agar bekommen.

Es war also eine scharfe Kontrolle jeder benützten Agarprobe auf chemische, wachstumfördernde Beimengungen notwendig. Bei schlecht gereinigtem Agar genügte der Zusatz von Traubenzucker, um Bakterien, wie Coli- und Paratyphus B-Bacillen, anaerob wachsen zu lassen. Da wir aus früheren in flüssigen Nährböden ausgeführten Versuchen[1]) wußten, daß diese Bakterien den Sauerstoff nur entbehren können, wenn ihnen außer Traubenzucker eine kompliziertere organische Stickstoffverbindung zur Verfügung steht, so mußten wir eine solche im Stangenagar annehmen. Wir haben also unsere Agarkontrolle folgendermaßen gestaltet: Als Testobjekt wurden die anspruchslosesten der zu untersuchenden Bakterien, hier also Paratyphus B-Bacillen, gewählt. Mit diesen wurden folgende Proben beimpft: I. Probe: Schüttelkultur aus $2^1/_2$ proz. Agaragarlösung in destilliertem Wasser ohne jeden Zusatz. II. Probe: Schüttelkultur aus demselben Agaragar wie I mit 0,5% Traubenzucker. III. Probe: Schüttelkultur aus demselben Agaragar wie I mit 0,5% Kochsalz, 0,2% Kaliumbiphosphat, 0,5% Ammoniumsulfat. In den beiden ersten Proben durfte weder aerobes noch anaerobes Wachstum auftreten, denn der ersten waren ja überhaupt keine Nährstoffe, der zweiten nur eine Kohlenstoffquelle zugesetzt. Auch nach 4 tägiger Bebrütung durften unter dem Mikroskop keine Kolonien sichtbar sein. In der III. Probe, der außer den anorganischen Nährsalzen nur eine Stickstoffquelle beigefügt war, durfte kein *anaerobes* Wachstum stattfinden. Daß darin auch jede *aerobe* Vermehrung ausblieb, war wegen mangelnder Reinigung bei den wenigsten Agarproben zu erreichen, doch genügte es für diese, die Erfahrungen in flüssigen Nährböden nur ergänzenden Versuchen, daß kein *anaerobes* Wachstum möglich war. Nur so geprüfter Agar ist verwendet worden.

Die Untersuchung auf anaerobes Wachstum in Schüttelkulturen hat gegenüber der Züchtung in Wasserstoffatmosphäre den Vorteil der Einfachheit und der jeweils von selbst gegebenen Kontrolle, daß derselbe Nährboden aerobes Wachstum erlaubt. Daß in der Tiefe einer Schüttelkultur genügender Sauerstoffmangel herrscht, um von Anaerobiose sprechen zu können, beweist das Wachstum obligater Anaërobier in hohen Schichten von Traubenzucker-Nähragar. Wie steht es nun mit den Fehlerquellen dieser Methode? Eine gewisse Schwierigkeit kann darin liegen, daß die entstehenden Kolonien in agarhaltigen künstlichen Nährböden des öfteren und besonders anfangs sehr klein sind und deshalb in der Tiefe des Agars auch unter dem Mikroskop nicht immer mit Sicherheit als solche erkennbar sind; denn auch der sorgfältig filtrierte Agar zeigt oft bei mikroskopischer Betrachtung feinste Partikelchen, deren sichere Unterscheidung von kleinsten Kolonien nicht immer möglich ist. Wir haben nun in seltenen Fällen bei Agarprüfungen, wenn die Reinigung nicht gut gelungen war, nach Traubenzuckerzusatz 1 oder 2 isolierte Gasblasen in der Tiefe der Agarsäule auftreten sehen, deren Herkunft wir uns nicht erklären konnten, da auch unter dem Mikroskop keine Kolonien in der Tiefe, auch nicht in der unmittelbaren Umgebung der Gasblasen, zu finden waren. Das war uns Veranlassung, einige Erfahrungen über die Vorgänge bei anaerobem Wachstum in *Schüttelkulturen* und die Entstehung der Gasblasen und Spalten zu sammeln.

Es zeigte sich, daß die Agarsäule der Schüttelkulturen nur dann zersprengt wird, wenn der Agar dem Reagensglas fest anliegt, der Raum zwischen Nährboden und Glaswand also nur ein capillarer ist. Stellt man z. B. im Traubenzuckernähragar eine Schüttelkultur mit Colibacillen her, läßt erstarren, zieht dann die Agarsäule heraus, (am bequemsten verwendet man dazu die auf beiden Seiten offenen Burri-Röhrchen), legt sie in

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **86**, H. 5, 1921.

eine Petrischale und bebrütet, so wird die Oberfläche der Säule von einem dichten Bakterienrasen überzogen, in der Tiefe entstehen etwas später massenhaft Kolonien, aber die Säule zerreißt nicht. Nur dort, wo sie der Unterlage aufliegt, entstehen einige Spalten. Bei dieser Versuchsanordnung kann also das im Innern der Agarsäule gebildete Gas nach außen diffundieren. Der Agar zerreißt in typischer Weise nur, wenn das Gas nicht nach außen treten kann, sobald er rings von Glas umschlossen ist.

Was geschieht aber, wenn die Gasbildung nur in dem capillaren Raum vor sich geht, nicht auch im Innern des Agars? Läßt man Traubenzucker-Nähragar in einem Reagensröhrchen erstarren, taucht eine Nadel in eine Paratyphus B-Kultur und löst mit ihr die Agarsäule in einer obersten, $^1/_4$ cm hohen Schicht ringsum vom Glase ab, so daß man also nur den capillaren Raum zwischen Agarsäule und Glas beimpft hat, und bebrütet dann das Röhrchen, so wird nun der Agar ähnlich zerrissen, wie wenn man eine Schüttelkultur angelegt und die Bakterien in der ganzen Agarmasse verteilt hätte. Ja, man braucht nicht einmal den capillaren Raum mit der Nadel zu eröffnen, wenn man auf ein steriles, frisch erstarrtes Traubenzucker-Nähragarröhrchen zwei Tropfen einer Paratyphus B-Bouillonkultur tropft und bebrütet, so ist am nächsten Tag der Agar zerrissen, und im Innern der Säule sind natürlich keine Kolonien zu sehen. Wir machen also die Feststellung, daß auch an solchen Stellen der Agarsäule Gasblasen gefunden werden, wo überhaupt keine Bakterien waren, welche das Gas bilden konnten. Den Mechanismus dieses Vorgangs haben wir uns so vorzustellen, daß die Bakterien im capillaren Raum nach unten wuchern, in der feinen Flüssigkeitsschicht, die natürlich Traubenzucker und Nährstoffe enthält, Gas bilden, dieses Gas infolge der Adhäsionskräfte durch den capillaren Spalt nicht entweichen kann, sondern den Agar zusammenpreßt, bis er springt. Dann natürlich wuchern die Bakterien an den Spalten entlang in den Agar hinein und können von dort aus weitere Sprengungen vornehmen.

Verfolgte man die einzelnen Gasblasen, so konnte man oft die Kommunikation mit dem capillaren Raum finden. Manchmal aber schienen einzelne Gasblasen rings von Agar umschlossen zu liegen und mußten doch von außen her eingedrungen sein. Man hatte allerdings bei dem Auftreten der Gasblasen im Innern der Agarsäule daran zu denken, daß vielleicht kohlenhydratspaltende Fermente, die durch die Lebenstätigkeit der Bakterien im capillaren Raum entstehen, in den Agar diffundieren und dort eine Gasentwicklung veranlassen. Für diese Annahme fehlt eine Grundlage. Denn es gelingt bekanntlich nicht, in keimfreien Filtraten solcher Kulturen Fermente nachzuweisen, die aus Traubenzucker Gas bilden; auch aus unseren Stämmen konnten wir in Versuchen, auf die hier nicht eingegangen werden kann, keine solchen Fermente gewinnen.

Nun ergab sich die für uns entscheidende Frage: Herrschen in diesem capillaren Raum anaerobe Verhältnisse? oder liegt hier eine Fehlerquelle bei der Verwendung hoher Schichten vor, so daß man aus dem Auftreten von Gasblasen in der Tiefe einer Schüttelkultur nicht auf anaerobes Wachstum schließen darf, wenn die Kolonien so klein sind, daß sie nicht mit völliger Sicherheit als solche erkannt werden können? Aus unseren früher bereits veröffentlichten Versuchen in flüssigen Nährböden war uns bekannt, daß sich der Paratyphus-B-Bacillus im Milchsäure-Ammoniak-nährboden ohne Sauerstoff nicht vermehren und unter diesen Umständen den Traubenzucker nicht vergären kann. Da dies feststeht, hatten wir also die Möglichkeit zu prüfen, ob in dem capillaren Raum zwischen Glaswand und Agarsäule Sauerstoff zur Verfügung steht oder nicht. Wir hatten also nur den zuletzt besprochenen, mit Traubenzucker-nähragar durchgeführten Versuch mit diesem einfachen künstlichen Nährboden zu wiederholen. Auf eine hohe Schicht frisch erstarrten Milchsäure-Ammoniak-Agars mit 0,5% Traubenzucker wurden einige Tropfen einer flüssigen Milchsäure-Ammoniakkultur von Paratyphus B-Bacillen getropft und dann bebrütet. Es trat keine Gasbildung auf; weder in dem capillaren Raum noch im Innern des Agars waren Gasblasen zu sehen. Natürlich war dabei Voraussetzung, daß der Stangenagar vorher gereinigt und daraufhin geprüft worden war, ob er nicht Beimengungen enthält, die von sich aus eine Anaerobiose dieser Bakterien gestatteten. In einem Nährboden, von dem wir wissen, daß er kein anaerobes Wachstum zuläßt, fehlt also auch das Wachstum und die Traubenzuckervergärung in diesem capillaren Raum: wir haben also hier anaerobe Verhältnisse anzunehmen.

Somit haben wir erfahren, daß im Innern des Agars entstehendes Gas diesen nur dann zerreißt, wenn er fest vom Glas umschlossen ist. Weiter sahen wir, daß die Bakterien in den capillaren Raum zwischen Agarsäule und Glaswand hineinwachsen und von dort aus durch ihre Gasbildung den Agar ebenso zersprengen können, als wenn sie im Innern der Agarsäule liegen; in diesem capillaren Raum herrschen aber, wie im Innern der Agarsäule, anaerobe Verhältnisse. Es darf also, wenn dafür gesorgt ist, daß der Agar sich nicht durch Austrocknung von der Glaswand zurückgezogen hat, auch dann aus der Gasbildung in der Tiefe einer Schüttelkultur auf Anaerobiose geschlossen werden, wenn die Kolonien in der Tiefe so klein sind, daß sie nicht mit aller Sicherheit als solche erkannt werden können.

Wir sind nun in der Beantwortung der Frage, ob unter Sauerstoffausschluß eine Ammoniakassimilation möglich ist, zu folgenden Resultaten gekommen: Die *ammoniakassimilierenden Typhusstämme* sind im Milchsäure-Ammoniaknährboden nicht imstande, ohne Sauerstoff zu gedeihen. In demselben Nährboden, in dem bei Luftzutritt das Ammoniak assimi-

liert werden kann, ist dies unter anaëroben Bedingungen unmöglich. Der aus unseren gebräuchlichen Laboratoriumsnährböden als fakultativer Anaerobier bekannte Typhusbacillus ist also im Milchsäure-Ammoniaknährboden ein strenger Aërobier. Er wächst im flüssigen Milchsäure-Ammoniaknährboden, sobald ihm der Sauerstoff entzogen ist, nicht, läßt man nach mehreren Tagen Luft eintreten, so beginnt einige Zeit später seine Vermehrung; in Schüttelkulturen entsprechender Zusammensetzung treten nur unmittelbar unter der Oberfläche in einer wenige Millimeter breiten Zone Kolonien auf. — Bei einer besonderen Gelegenheit, — (bei den Versuchen mit Vibrio Metschnikoff), — konnten wir unter *aeroben* Verhältnissen beobachten, daß die Ammoniakassimilation an die Bedingung geknüpft war, daß zwei Energiequellen, Milchsäure und Traubenzucker, gleichzeitig verfügbar waren. Setzte man nun dem Milchsäure-Ammoniaknährboden 0,5% Traubenzucker zu und prüfte, ob jetzt die ammoniakassimilierenden Typhusbacillen auch unter Sauerstoffausschluß von ihrer Fähigkeit, das Ammoniak zu verwerten, Gebrauch machen können, so zeigte sich, daß dies auch dann nicht der Fall ist. Das Ammoniak konnte auch nach Zusatz dieser zweiten Energiequelle nicht zum Aufbau benützt werden, und deshalb trat keine Vergärung des Traubenzuckers auf, solange anaërobe Bedingungen herrschten. In dieser Unfähigkeit zur Ammoniakassimilation unter Sauerstoffausschluß gleichen also diese Typhusstämme den Paratyphus B-Bacillen, von denen wir früher bereits ganz dasselbe berichten konnten[1]). Auch diese vermochten sich, wenn der Sauerstoff fehlte, den im Traubenzucker vorhandenen Energievorrat nicht nutzbar zu machen.

Ist dies nun eine Besonderheit dieser beiden Bakterienarten gerade im Milchsäure-Ammoniaknährboden? Ist vielleicht mit einer anderen Kohlenstoffquelle, z. B. der gerade durch Paratyphus B-Bacillen besonders gut ausnützbaren Citronensäure, doch eine Ammoniakassimilation unter Sauerstoffausschluß möglich? Es wurden also im flüssigen und agarhaltigen Citronensäure-Ammoniaknährboden von der oben angegebenen Zusammensetzung Versuche gemacht, und es ergab sich, daß weder die ammoniakassimilierenden Typhusstämme, noch die Paratyphus B-Bacillen darin *anaerob* zu wachsen vermochten. Auch der Zusatz verschiedener Mengen Traubenzucker als zweiter Energiequelle änderte daran nichts; wenn also Citronensäure und 0,5% oder 1% Traubenzucker verfügbar waren, trat unter Sauerstoffausschluß keine Vermehrung der ammoniakassimilierenden Typhusbacillen und in der Tiefe der Agarschüttelkulturen keine Gasbildung durch die Paratyphus B-Bacillen auf.

Und es zeigte sich, daß auch die andern untersuchten Bakterienarten von ihrer synthetischen Fähigkeit, aus Ammoniak als einziger Stickstoffquelle ihre Leibessubstanz aufzubauen, keinen Gebrauch mehr

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **86**, H. 5, 1921.

machen konnten, sobald ihnen der Sauerstoff entzogen war. Die ammoniakassimilierenden Shiga-Kruse-Stämme konnten im Milchsäure-Ammoniaknährboden nicht *anaerob* gedeihen. Und das gleiche haben wir früher bereits von den Colibacillen berichtet. Auch bei diesen gelang unter Sauerstoffabschluß die Ammoniakassimilation selbst nach Zugabe von 0,5% Milchzucker oder 0,5% Traubenzucker nicht, und es blieb die Spaltung dieser Kohlenhydrate aus.

Vorhin besprochene Versuche haben uns gelehrt, daß die Verwertung der von uns untersuchten Aminosäuren (mit Ausnahme des Tryptophans) ihrem Wesen nach eine Ammoniakassimilation ist. Dadurch werden unsere früher mitgeteilten Beobachtungen, daß Paratyphus B-Bacillen diese Substanzen unter anaeroben Verhältnissen so wenig wie das Ammoniak als Stickstoffquelle benützen können, verständlich. Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure oder Leucin gestatteten weder als Zusätze zum Milchsäure-Ammoniaknährboden noch nach Beifügung von 0,5% Traubenzucker als dritter verfügbarer Energiequelle einen Aufbau unter Sauerstoffausschluß.

Das Tryptophan war, wie wir früher zeigten, der einzige aufgefundene Nährstoff bekannter chemischer Konstitution, aus dem die zur Ammoniakassimilation nicht befähigten Keime von Typhus-, Paratyphus A- und Shiga-Kruse-Bacillen ihren Stickstoffbedarf unter aeroben Verhältnissen decken konnten; diese Verbindung erspart also die Ammoniakassimilation. Und so ist es verständlich, daß sie unter bestimmten Bedingungen anaerobes Wachstum erlaubt. Die ammoniakassimilierenden Typhusstämme konnten zwar, wie die Paratyphus B-Bacillen, mit Tryptophan allein nicht anaerob wachsen, wohl aber sobald Traubenzucker gleichzeitig verfügbar war. Dann trat auch unter Sauerstoffabschluß in flüssigen Nährböden Wachstum und Säurebildung, in Agarschüttelkulturen Vermehrung in der Tiefe und bei den Paratyphus B-Bacillen auch Gasbildung ein. Hier also besteht kein Zwang mehr zur Ammoniakassimilation, und deshalb tritt auch die Differenz zwischen ammoniakassimilierenden und ammoniaknichtassimilierenden Typhusstämmen nicht mehr in die Erscheinung. Es zeigte sich, daß die Bedingungen zu anaerobem Wachstum für diese beiden Typen die gleichen sind. Denn es kommt unter Sauerstoffabschluß dem anspruchslosen Typ seine Fähigkeit zur Ammoniakassimilation nicht zugute.

Die früher schon mitgeteilten Versuche zeigten[1]), daß die ammoniaknichtassimilierenden Stämme von Typhus-, Paratyphus A- und Shiga-Kruse-Bacillen mit Tryptophan und Traubenzucker als Zusätze zum Milchsäure-Ammoniaknährboden auch anaerob wuchsen, einerlei, ob sie den Traubenzucker bis zur Kohlensäure spalten, also voll ausnützen konnten oder nicht. Der Traubenzucker war nicht durch Milchsäure,

[1]) l. c.

auch nicht durch das Mehrfache der zu aerobem Wachstum nötigen Menge ersetzbar. Ob andere Stoffe an seine Stelle treten können, konnten wir aus Mangel an Tryptophan nicht untersuchen, wäre aber von großem Interesse. Jedenfalls ist er nicht durch eine beliebige, von diesen Bakterien angreifbare Energiequelle zu ersetzen.

Wir stellten also fest, daß die Ammoniakassimilation unter Sauerstoffausschluß nicht möglich ist, auch nicht nach Zufuhr vermehrter Energie, und daß anaerobes Wachstum erst auftritt, wenn die Notwendigkeit der Ammoniakassimilation durch Zugabe eines höheren Eiweißspaltproduktes aufgehoben ist. Es stimmen also unter anaeroben Verhältnissen die Ernährungsbedürfnisse der beiden verschieden begabten Typen von Typhusbacillen überein.

Allgemeine Schlußfolgerungen.

Die speziellen Resultate über die Ernährungsbedürfnisse und synthetischen Fähigkeiten der einzelnen systematisch untersuchten Bakterienarten, Paratyphus B-, Typhus-, Paratyphus A-, Shiga-Kruse- und Kolibacillen haben wir meistens am Schluß der betreffenden Kapitel bereits zusammengefaßt. Hier sollen jetzt nur die wichtigsten Ergebnisse in Form einer Tabelle zusammengestellt werden, aus der vor allem die *verschiedene Verwertung* der als Kohlenstoffquellen gebotenen Substanzen durch die einzelnen *Bakterienarten* hervorgehoben werden soll.

Wo in der Tabelle durch ein + Wachstum vermerkt ist, handelt es sich um dauernde, in Passagen fortführbare Vermehrung; eine gelegentlich nach der erstmaligen Beimpfung vom Nähragar auftretende Vermehrung ist in der Tabelle nicht angegeben, da diese nicht als Wachstum anzusehen ist, das allein auf die in bekannter Menge in den Nährboden eingebrachten chemischen Substanzen zurückzuführen ist. Die deutliche und kräftige Vermehrung ist als ++, ausgesprochen schwaches, aber dauernd fortführbares Wachstum als + bezeichnet. Wo nur einzelne Stämme der gleichen Art gediehen sind, wurde das mit ++0 oder 0++ vermerkt, je nachdem die Mehrzahl oder die Minderheit der geprüften Stämme gewachsen ist. +0 oder 0+ bedeutet entsprechend das schwache Wachstum nur einzelner Stämme. War die Vermehrung nur auf dem Umweg über einen anderen einfachen, künstlichen Nährboden und nicht direkt bei der Einsaat vom Nähragar zu erreichen, so ist dieses durch (+) angezeigt. Fehlt in einer Rubrik jeder Vermerk, so sind die diesbezüglichen Versuche nicht angestellt worden.

Wir wollen uns auf einige allgemeine Gesichtspunkte beschränken, die sich aus unseren Untersuchungen unter einfachen übersichtlichen Ernährungsverhältnissen ergeben. Im Vordergrund steht die *Beziehung zwischen dem Stoffwechsel und dem Sauerstoffbedürfnis.* Je einfacher die Nährstoffe und je geringer ihre Zahl ist, desto dringender wird der Sauerstoff gebraucht. Umgekehrt betrachtet, sind die Bakterien desto anspruchsloser, je mehr Sauerstoff ihnen zur Verfügung steht. Und es ist interessant, zu beobachten, wie hoch die Ansprüche an das Nährmaterial sind, wenn der Sauerstoff überhaupt entbehrlich gemacht werden soll. Keime, die unter aeroben Verhältnissen weitgehende synthe-

Tabelle IX.

Kohlenstoffquelle	Essigsäure	Oxalsäure	Milchsäure	Bernsteinsäure	Äpfelsäure	Weinsäure	Citronensäure	Glycerin	Arabinose	Milchsäure	Glykokoll	Milchsäure	Alanin	Milchsäure	Asparaginsäure	Milchsäure	Leucin	Milchsäure	Milchsäure
Stickstoffquelle	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Nitrat		Glykokoll		Alanin		Asparaginsäure		Leucin	Harnstoff
Paratyphus B-Bacillen	++0	+0	++	++	++	0+?	++	++	++	0+?	0+	++	++	++	++	++	0+	++	++
Ammoniak-assimilierende Typhusstämme	0	0	++	0	0+	0	++	++	0	0	0	++	++	++	+0	++	0	++	++0
Ammoniak-nicht-assimilierende Typhusstämme	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ammoniak-assimilier. Paratyphus A-Stämme	0	0	++	0	0(+)		++0	++	0	+0	0	++	+	+	0+	++	0	++	0+
Ammoniak-nicht-assimilierende Paratyphus A-Stämme	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0+?	0	0+?	0
Ammoniak-assimilier. Shiga-Kruse-Stämme	0	0	++	0	0(+)		0(+)	++	0	0	0	+	0	0+	0	++	0	++	
Ammoniak-nicht-assimilierende Shiga-Kruse-Stämme	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Colibacillen	+	0+	++	++	++	0	0+	++	++	0+	0	++	++	++	++	++	0+	++	++

tische Fähigkeiten besitzen, werden unter anaeroben Bedingungen ebenso anspruchsvoll wie die Bakterien, denen die Fähigkeit überhaupt abgeht, sich aus wenigen einfachen Substanzen aufzubauen. Unter Sauerstoffausschluß ist offenbar eine Synthese aus Ammoniak überhaupt nicht möglich. Denn solange dieses die einzige Stickstoffquelle ist, kann man bei den von uns untersuchten ammoniakverwertenden Bakterien nicht dadurch Anaerobiose erzielen, daß man in einem zu aerobem Wachstum geeigneten Nährboden die Energiequellen vervielfacht oder außerdem noch neue hinzufügt. Es müssen dazu vielmehr zwei ganz bestimmte Bedingungen gleichzeitig erfüllt sein. Den Bakterien muß zum Leben ohne Sauerstoff eine *besonders geartete Energiequelle* und gleichzeitig eine *kompliziertere organische Stickstoffverbindung* zur Verfügung stehen.

Es ist natürlich nicht gesagt, daß die in der Luft gegebene Sauerstoffkonzentration, die wir in unseren Versuchen durch Herstellung der flachen Flüssigkeitsschicht nach Möglichkeit zu erreichen suchten, das Optimum für alle Bakterien und für jede Ernährungsbedingung darstellt. Und es wäre wichtig, nicht nur den Einfluß einer verminderten, sondern auch einer vermehrten Sauerstoffzufuhr auf den Verwendungsstoffwechsel der Bakterien zu untersuchen.

Eine andere wichtige Frage wollen wir aus den Resultaten unserer Versuche zu beantworten suchen. *Inwieweit sind Stoffwechselunterschiede als Artunterschiede verwertbar?* Unsere Untersuchungen boten uns eine vorzügliche Gelegenheit, die *individuellen Schwankungen* der einzelnen Stämme innerhalb einer und derselben Art zu beobachten und zu verfolgen. Manche Forscher haben derartige ernährungsphysiologische Abweichungen eines Stammes von den andern als Variation oder Mutation oder gar Artunterschied aufgefaßt. Andere dagegen leugnen die Konstanz der Arten ab und halten den Übergang der einen in die andere für erwiesen. Diese Fragen sind natürlich nicht nur für die Systematik der Bakterien wichtig, sondern sie beanspruchen ein viel allgemeineres naturwissenschaftliches Interesse. Denn gerade an den Bakterien als den einfachsten Lebewesen werden die Probleme der Variation und Mutation viel bearbeitet. Schon Robert *Koch* hat gefordert, daß man für jede Bakterienart sowohl die konstanten als auch die schwankenden Eigenschaften festzustellen hat. Die Richtigkeit dieser These ist auch durch unsere Untersuchungen erwiesen worden. Für die einzelnen Arten gibt es *konstante Eigenschaften, die entweder auf das Vorhandensein oder auf das Fehlen einer Funktion zurückgehen*; es gibt außerdem *schwankende Eigenschaften*, wobei diese in einer ganz bestimmten Richtung gehende Unbeständigkeit ebenso charakteristisch für die betreffende Art sein kann wie die konstanten Eigenschaften. Hierzu gehört in unseren Versuchen die Fähigkeit, das Ammoniak zu assimilieren. Vom naturwissenschaftlichen Standpunkt be-

trachtet, ist es besonders interessant, daß innerhalb ein und derselben Art die Befähigung zu einer so bedeutsamen Funktion, wie es die Ammoniakassimilation ist, vorhanden ist oder fehlt. Es ließ sich nachweisen, daß diese individuellen Schwankungen auf die verschiedenen Fähigkeiten der einzelnen Keime desselben Stammes zurückgehen. Aber nicht nur diese *synthetischen Fähigkeiten in der Stickstoffverwertung* können schwanken, sondern auch *dissimilatorische* Eigenschaften, wie wir dies bei der Verwertung verschiedener Kohlenstoffverbindungen als Kohlenstoff- und Energiequellen gesehen haben. Und schließlich ist auch der *Bedarf an Energie* bei den einzelnen Stämmen gleicher Art verschieden; es gibt in dieser Beziehung anspruchslose und anspruchsvolle.

Trotz dieser beträchtlichen Schwankungen assimilatorischer und dissimilatorischer Funktionen sind aber die Stämme in anderen Eigenschaften so typisch, daß an ihrer Zugehörigkeit zu einer und derselben Art kein Zweifel bestehen kann. Besonders markant kommt dies in der feinsten Reaktion auf ihre stoffliche Zusammensetzung, in ihren serologischen Eigenschaften zum Ausdruck. Wir haben ausführlich besprochen, daß trotz einer so weitgehenden Verschiedenheit, wie es die Möglichkeit oder Unmöglichkeit, Ammoniak zu assimilieren, ist, z. B. unter den in dieser Beziehung verschiedenen Stämmen von Typhus-Bacillen serologisch Identität besteht.

Wenn auch unsere Versuche Schwankungen im Verwendungsstoffwechsel der Bakterien derselben Art zeigen, so geht doch einwandfrei aus ihnen hervor, daß *keineswegs alle Stoffwechseleigenschaften einer Art schwankend* und deshalb zur systematischen Verwendung unbrauchbar wären. Es müssen vielmehr bei jeder Art unter den ernährungsphysiologischen Eigenschaften unterschieden werden: erstens solche, die immer vorhanden sind, zweitens solche, die niemals vorhanden sind, und drittens solche, die schwanken, die also vorhanden sein oder fehlen können. *Erst durch alle drei Kategorien von Eigenschaften ist die Art charakterisiert.* Diese drei Merkmale sind jedesmal festzustellen, wenn Stoffwechselunterschiede als Artunterschiede gewertet werden. Geht man auf diese Weise vor, so überzeugt man sich, daß die Schwankungen immer *nur bestimmte* Eigenschaften betreffen und damit auch diese Unbeständigkeit für die Art charakteristisch ist. Übergänge einer Art in die andere kommen aber dadurch *nicht* zustande, vielmehr überzeugt man sich, wenn man die Eigenschaften der Bakterien unter diesem Gesichtspunkt betrachtet, von der *Konstanz der Art.*

Das hierzu nötige Studium des individuellen Energiebedürfnisses und der speziellen Fähigkeiten unter den verschiedenen Stämmen der gleichen Art oder gar den verschiedenen Individuen desselben Stammes wurde ermöglicht durch das Arbeiten unter übersichtlichen Ernährungsverhältnissen in einfachen künstlichen Nährböden.

Serologische Versuche mit Antigenen und Antikörpern an der überlebenden, künstlich durchströmten Milz.

Von

Martin Hahn und Emil v. Skramlik.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 18. April 1922.)

Als Hauptergebnis der Tätigkeitsweise der überlebenden künstlich durchströmten Meerschweinchenleber konnte in zahlreichen serologischen Versuchen[1]) eine Verankerung von Antikörpern wie Antigenen an die Gewebszellen festgestellt werden. Durch diesen Vorgang werden die gebundenen Körper selbst nur wenig beeinflußt: In einer Leber, in der *Bakterienagglutinine* festgehalten werden, findet eine Agglutination der passenden Bakterien statt, *hämolytische Amboceptoren* vermögen trotz ihrer Verankerung an die Leberzellen die zugehörigen Blutkörperchen zu beeinflussen, und zwar im Sinne einer stärkeren Verklebbarkeit, die zur Agglutination im Organ führt, worauf nach Ablauf einer längeren Zeit die Lyse folgt. *Tetanolysin* schädigt auch im Lebergewebe später durchgeleitete Blutkörperchen schwer.

Alle diese Erfahrungen hatten die Frage nahegelegt, ob es sich dabei um Wirkungen handelt, die nur von einem Organ, der Leber, ausgelöst werden, oder ob etwa andere Gewebsarten in gleicher Weise tätig sein können. Eine Prüfung des Verhaltens der *Milz* erschien hier besonders am Platze. Ihre Funktion ist immer noch ziemlich dunkel, vornehmlich darum, weil die bisherige Experimentiertechnik, die in der gänzlichen Entfernung des Organs aus dem Körper bestand, zu schwankenden Ergebnissen geführt hat. Wir wissen serologisch von der Milz nur das eine mit Sicherheit, daß durch ihre Exstirpation die Bildung von Antikörpern[2]) verzögert wird.

Zur Untersuchung der Milzfunktion haben wir uns der gleichen Versuchstechnik bedient wie bei der Leber[3]); doch mußte die Methodik

---

[1]) *M. Hahn* und *Emil von Skramlik*, diese Zeitschr. **98**, 120. 1919; **112**, 151. 1920; **130**, 80. 1922.

[2]) Siehe z. B. *L. Deutsch*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **28**, 45. 1900; dort auch weitere Literatur.

[3]) *Emil v. Skramlik*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **180**, 1. 1920.

zur künstlichen Durchströmung der Milz erst ausgebildet werden, was mit nicht geringen Schwierigkeiten verbunden war. Versuchstiere von der Größe eines Kaninchens waren nicht zu verwenden. In die kleinen zu- und abführenden Gefäße der Milz lassen sich wohl Kanülen einbinden, aber die Enge ihres Lumens bedeutet für den Flüssigkeitsdurchgang einen ganz gewaltigen Widerstand. Das geeignetste Versuchstier, der Hund, konnte nicht herangezogen werden, weil die engen Milzgefäße, vor allem die Arterien, auf eine längere Strecke im Peritoneum verlaufen und sich vor Eintritt in den langgestreckten Hilus in eine ganze Anzahl feiner Äste aufsplittern, von denen auch Stämmchen zu dem benachbarten Magen abgehen. Das bedeutet eine große Schwierigkeit bei Anwendung von Nährlösungen z. B. von Typus Ringer-Locke, die durch die Gefäßwand hindurchtreten. So sahen wir uns genötigt, am Hammel zu experimentieren, dessen Serum wohl eine ganze Anzahl von Vorgängen hemmt, was sich in unseren Versuchen unangenehm bemerkbar gemacht hat, bei dem aber die anatomischen Verhältnisse zur Ausführung der Operation sehr günstig liegen. Die Einzelheiten der Versuchstechnik sind anderorts beschrieben[1]); wir möchten hier nur noch darauf hinweisen, daß die Entfernung von Blutresten aus dem Organ viel schwieriger durchzuführen ist, wie bei der Leber. Der lakunäre Bau der Milz behindert teilweise den Zutritt der eingeleiteten Nährlösung, so daß es stets gewisse Partien gibt, die nicht, oder nicht gründlich ausgespült wurden, deren Inhalt aber dann bei Durchführung des eigentlichen Experiments sehr störend wirken kann.

In Übereinstimmung mit den Versuchen an der Meerschweinchenleber prüften wir das Verhalten der Hammelmilz bei Durchleitung von arteigenen und artfremden Blutkörperchen, von Tetanustoxin sowie Bakterien. Die einzelnen Versuchsreihen sind noch nicht als abgeschlossen zu betrachten. Daß sie nicht in allen Einzelheiten zu Ende geführt sind, lag an der Schwierigkeit der Beschaffung von Hammeln zu Versuchszwecken.

1. Versuche mit Blutkörperchen.

Leitet man durch eine Hammelmilz arteigene Blutkörperchen, so kann man an ihnen auch im Verlaufe eines mehrstündigen Versuches keine Veränderungen wahrnehmen. Anders gestalten sich die Verhältnisse, wenn man die Blutkörperchen eines artfremden Tieres durchströmen läßt. So werden Kaninchenblutkörperchen (V. 8 vom 24. XI. und V. 9 vom 20. XII. 1920) in 10proz. Aufschwemmung bei Durchleitung durch die Milz in einem ganz kurzen Zeitraum, etwa 5′, agglutiniert und nach Ablauf einer weiteren Stunde auch schwach gelöst. Diese Wirkung ist dem Anschein nach auf das Vorhandensein eines

[1]) *Emil v. Skramlik*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **194**, 118. 1922.

Normalamboceptors im Milzgewebe zurückzuführen. Ein solcher läßt sich auch in der kreisenden Flüssigkeit nachweisen, freilich erst — und darauf sie mit Nachdruck hingewiesen — nach fünfstündigem Durchgang durch das Organ. Setzt man dann zu Proben der durchgeleiteten Flüssigkeit Meerschweinchenkomplement hinzu, so findet eine teilweise Lösung von *Kaninchenblut*körperchen statt. Die Wirkungsweise dieses Amboceptors kann einigermaßen als spezifische bezeichnet werden, denn *Menschen-* und *Hammelblut*körperchen bleiben auch nach Komplementzusatz ungelöst. Wie weit es sich bei diesem Amboceptor um einen Körper handelt, der als Inhaltsbestandteil der Milzzellen aufzufassen ist, oder zu den Serumresten gehört, die nicht völlig ausgespült werden können, läßt sich auf Grund der bisherigen Versuche nicht entscheiden. Da schon aktives Hammelserum Kaninchenblutkörperchen agglutiniert, könnte man zur Annahme neigen, daß es sich um einen Serumbestandteil handelt. Auffallend bleibt aber jedenfalls, daß er aber erst nach so langer Zeit in die kreisende Flüssigkeit übertritt. Über alle weiteren Versuche zur Klärung der Frage nach dem Verhalten der Milz zu Blutkörperchen wie zu hämolytischen Amboceptoren wird in der anschließenden Arbeit berichtet[1]).

2. Versuche mit Tetanustoxin.

Leitet man durch die Milz Tetanustoxin in Ringerlösung (Verdünnung 1 : 500), so wird seine lytische Komponente binnen wenigen Minuten zum größten Teil, im Verlaufe einer Stunde fast vollständig aus der kreisenden Flüssigkeit entfernt (siehe die beigefügte Tabelle I).

Tabelle I.

T. G. Tetanusgift.

Vor Durchgang				Nach 8′				Nach 60′ Durchgang			
T. G.	NaCl	KBl.	Erfolg	T. G.	NaCl	KBl.	Erfolg	T. G.	NaCl	KBl.	Erfolg
1,0	0,0	1,0	gelöst in 1′	1,0	0,0	1,0	Spürchen gelöst nach 1ʰ	1,0	0,0	1,0	nach 1ʰ ungelöst
0,75	0,25	1,0	„ „ 2′	0,75	0,25	1,0		0,75	0,25	1,0	
0,5	0,5	1,0	„ „ 3′	0,5	0.5	1.0		0,5	0,5	1.0	
0.25	0,75	1,0	„ „ 4′	0,25	0,75	1,0	ungelöst nach 1ʰ	0,25	0,75	1,0	
0,1	0.9	1,0		0.1	0,9	1,0		0,1	0,9	1,0	
0.0	1,0	1,0	ungelöst	0,0	1,0	1,0		0,0	1,0	1,0	

Indessen haben diese Versuche nicht die gleiche Beweiskraft für eine Bindung des Giftes an die Milzzellen, wie das bei der Leber der Fall war. Denn die nach Ablauf einer Stunde aus der kreisenden Flüssigkeit herausgenommenen Proben ergaben die Anwesenheit eines hemmenden Körpers, da auch zu der Probe hinzugesetztes frisches Tetanustoxin nicht in gleichem Maße hämolysierend wirkt (siehe Tabelle II). Der hemmende Körper gehört mit großer Wahrscheinlichkeit Serumresten

[1]) *Emil v. Skramlik* und *Otto Olsen*, diese Zeitschr. **131**, 320. 1922.

an, denn die Tetanolysinwirkung wird sowohl durch inaktives wie aktives Hammelserum gehemmt, von letzterem freilich nur in schwächerem Grade[1]).

Tabelle II.

Tetanusgift nach 2h Durchgang 1 : 500	Frisches Tetanusgift 1 : 500	NaCl	KBl.	Erfolg
1,0	0,5	0,0	1,0	Spur gelöst nach 1h
0,75	0,5	0,25	1,0	
0,5	0,5	0,5	1,0	
0,25	0,5	0,75	1,0	
0,1	0,5	0,9	1,0	Kuppe
0,0	0,5	1,0	1,0	in 3′ gelöst

Es ist nicht möglich, den Zellen das Gift zu entreißen, auch wiederholtes Ausspülen des Organs mit Ringerlösung ergab keine Spur des Giftes auch zu einer Zeit, wo der hemmende Körper sich noch nicht bemerkbar machte. Über den Verbleib des Giftes geben folgende Versuche Aufschluß. Leitet man durch eine mit Tetanusgift vorbehandelte Milz eine 5 proz. Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung, so setzt sofort eine starke Agglutination ein, die im Verlauf von wenigen Minuten komplett ist, so daß die kreisende Flüssigkeit ganz klar erscheint. Dieser Agglutination folgt sehr bald — nach weiteren 15′ — Lyse nach, die freilich nicht vollständig ist. Es verbleiben in der kreisenden Flüssigkeit stets Blutkörperchen in größerer Zahl. Diese Erscheinung ist nicht weiter auffallend, wenn man bedenkt, daß bei einem von Blutresten nicht völlig zu befreienden Organ stets die Möglichkeit vorliegt, daß Blutkörperchen an die kreisende Flüssigkeit abgegeben werden. Hammelblutkörperchen werden aber vom Tetanolysin nicht angegriffen. Gegen die Beweiskraft dieser Versuche für die Verankerung des Giftes an die Milzzellen könnte man anführen, daß ja Kaninchenblutkörperchen auch von einer *nicht* vorbehandelten Milz agglutiniert und schwach hämolysiert werden. Dagegen kann aber darauf hingewiesen werden, daß sich in einer Milz, durch die zuvor Tetanusgift geleitet wurde, beide Vorgänge — Agglutination und Lyse — viel *stärker*, vor allem aber *rascher* abspielen.

Der Verbleib des *Tetanusspasmins* konnte nur durch Tierversuche festgestellt werden. Injiziert man Mäusen gleichverdünnte Proben des Giftes vor und nach Durchgang durch die Milz, so ergibt sich (siehe Tabelle III) eine kleine Differenz. Bei deren Geringfügigkeit läßt sich aber nicht mit Sicherheit entscheiden, ob es sich um eine Bindung des Giftes an die Milzzellen handelt, oder ob etwa hier die Hemmung durch an die Durchströmungsflüssigkeit abgegebenen Milzbestandteile in Betracht kommt.

[1]) Die Anwesenheit dieses hemmenden Körpers wird es voraussichtlich auch unmöglich machen, eine Antitoxinbildung in der Milz nachzuweisen.

Tabelle III.

Maus 1	20 g Gewicht	erhält	1 ccm	auf	$^1/_{800}$	verdünnter	Giftprobe	vor	Durchgang,	stirbt nach 48h
„ 2	20 g „	„	1 ccm	„	$^1/_{2000}$	„	„	„	„	„ „ 96h
„ 3	18 g „	„	1 ccm	„	$^1/_{800}$	„	„	nach	„	„ „ 7h
„ 4	20 g „	„	1 ccm	„	$^1/_{2000}$	„	„	„	„	lebt nach 14h, ist aber leicht tetanisch.

3. Versuche mit Bakterien.

Leitet man durch eine Hammelmilz eine dichte Aufschwemmung von Colibakterien, so beobachtet man eine rasch zunehmende Aufhellung der kreisenden Flüssigkeit, die in einer Abnahme der Keime ihre Ursache hat.

Versuch 11 (8. II. 1921):

P_1 nach 5′ Durchgang enthält ca. $170 \cdot 10^6$ Keime im Kubikzentimeter
P_2 „ 1h „ „ „ $2{,}2 \cdot 10^6$ „ „ „

Es handelt sich bei diesem Geschehen um eine Agglutination der Bakterien im Gewebe, bedingt wahrscheinlich durch ein *Normalagglutinin.* Eine derartig große Verminderung der Bakterien (auf etwa $^1/_{80}$ des ursprünglichen Gehaltes) wurde in der *Leber nur nach Vorbehandlung* mit Agglutinin beobachtet, *niemals in einem intakten Organ.* Die in der Milz verbliebenen Serumreste sind in diesem Falle für den Eintritt der Agglutination nicht verantwortlich zu machen, da das volle Hammelserum wohl agglutiniert, aber schon in einer schwachen Verdünnung diese Eigenschaft einbüßt.

In den bei diesen Versuchen vielfach aufgetretenen hemmenden Eigenschaften des Serums ist auch die Ursache zu erblicken, warum wir es zur Durchströmung niemals verwendet haben, trotzdem es uns in beliebigen Mengen zur Verfügung stand und vor allen übrigen Durchströmungsflüssigkeiten eigentlich den Vorzug verdient.

Fassen wir die Ergebnisse der Untersuchung zusammen, so läßt sich vor allem sagen, daß sich die Hammelmilz in serologischen Versuchen vielfach gleichartig verhält wie die Meerschweinchenleber. Sie weicht in ihrem Verhalten vorwiegend nur dort ab, wo man als Ursache auch an eine Wirkung des Serums denken kann. Tetanusgift wird gebunden, aber nur dessen lytische Komponente wie in der Leber, die spastische erfährt kaum eine Verminderung im Gegensatz zur Leber, wo sich im Tierversuch eine deutliche Abnahme hat feststellen lassen. Die Milz enthält normalerweise Blutkörperchenamboceptoren sowie Agglutinine, die sich in der Leber niemals haben feststellen lassen.

Alles in allem herrscht aber eine gewisse Übereinstimmung zwischen Leber- und Milzfunktion in *serologischer Beziehung.* Das ist wohl auch einer der Gründe, warum die Milz im menschlichen wie tierischen Körper so leicht entbehrt werden kann.

Über die komplettierende Wirkung serumfreier Organe.

Nach Versuchen an der überlebenden, künstlich durchströmten Hammelmilz und Hammelleber.

Von

Emil v. Skramlik und **Otto Olsen.**

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 18. April 1922.)

In früheren Versuchen[1]) war festgestellt worden, daß die serumfreie Leber des Meerschweinchens die Wirkung eines hämolytischen Amboceptors zu komplettieren vermag. Leitet man durch die Meerschweinchenleber, die mittels Durchspülung mit Ringer-Locke-Lösung von Serumresten befreit ist, im künstlichen Kreislauf eine 5 proz. Aufschwemmung von Hammelblutkörperchen, die hammelblutlösenden Amboceptor in 2—3fach lösender Dosis enthält, so beobachtet man im Verlauf der Erscheinungen zwei Phasen. Zuerst tritt innerhalb von 30—40 Minuten eine Bindung der Blutkörperchen am Organ auf. Mikroskopische Untersuchungen[2]) zeigten, daß es sich dabei um eine Agglutination der roten Blutkörperchen in den Capillaren handelt. Im Anschluß an die Organbindung erfolgt dann während einer zweiten Phase, und zwar zumeist nach Ablauf von weiteren zwei Stunden eine teilweise Auflösung der Blutkörperchen, die sich in einer zunehmenden Rotfärbung der durch die Leber kreisenden Flüssigkeit äußert.

Die serumfreie Meerschweinchenleber kann also die Funktion des Serumkomplements übernehmen. Der Zerfall der Vorgänge in zwei wohl unterscheidbare Phasen, wie er im Organ auftritt, nämlich zunächst Agglutination und Organbindung, dann Hämolyse, braucht sich bekanntlich im Reagensglas bei der Komplementeinwirkung auf sensibilisierte, d. h. mit Amboceptor beladene Blutkörperchen nicht immer zu zeigen. Versetzt man nämlich im Reagensglas Blutkörperchen in Gegenwart eines zugehörigen Amboceptors in einer Dosis, die allein nicht agglutinierend wirkt, mit einem Überschuß von Komplement, so tritt in der

---

[1]) *Martin Hahn* und *Emil v. Skramlik*, diese Zeitschr. **98**, 120. 1919. — *Emil v. Skramlik*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **180**, 1. 1920.

[2]) *Emil v. Skramlik* und *Theodor Hünermann*, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **11**, 349. 1920.

Regel sogleich Hämolyse auf. Selbst bei mikroskopischer Verfolgung der Auflösungserscheinungen ist so keine Zusammenballung der Blutkörperchen wahrzunehmen. Indes läßt sich auch im Reagensglas eine Agglutination von sensibilisierten Blutkörperchen nachweisen, die der Komplementwirkung zuzuschreiben ist. Bekanntlich läßt sich das Komplement durch Dialyse, Einwirkung schwacher Säuren usw. in zwei Bestandteile zerlegen: in Endstück und Mittelstück. Nur das Gemisch beider Komponenten wirkt hämolytisch, jede für sich allein kann keine Auflösung sensibilisierter Blutkörperchen herbeiführen. Bei der Kohlensäurebehandlung von Meerschweinchenserum (*Liefmann*), die zur Darstellung der beiden Komplementkomponenten in unseren Versuchen ausgeführt wurde, geht das Mittelstück in den Niederschlag über, das Endstück bleibt in der überstehenden Flüssigkeit. Versetzt man nun Hammelblutkörperchen in Gegenwart von hämolytischem Amboceptor in einer solchen Konzentration, die allein nicht zusammenballt, mit einer Menge Mittelstück, die wiederum Hammelblutkörperchen allein nicht agglutiniert, so tritt alsbald eine Agglutination der roten Blutkörperchen auf. Es handelt sich hier um eine *agglutinationsfördernde Wirkung des Mittelstücks auf sensibilisierte Blutkörperchen*[1]). Die so agglutinierten Blutkörperchen werden nach Zusatz von Endstück zur Auflösung gebracht, das nach den bestehenden Vorstellungen immer erst dann in Tätigkeit tritt, wenn das Mittelstück auf die sensibilierten Blutkörperchen schon eingewirkt hat.

Wir können also die während des Durchströmungsversuchs im Organ beobachtete Abstufung der Vorgänge in der Reihenfolge: zuerst Agglutination und Organbindung, dann Auflösung der roten Blutkörperchen auch im Reagensglas nachahmen, und zwar so, daß die Komplementkomponenten nacheinander, nämlich zuerst Mittelstück und nach einem gewissen Intervall Endstück, den sensibilisierten Blutkörperchen zugesetzt werden. Diese Übereinstimmung im Ablauf der beschriebenen Phänomene legte den Gedanken nahe, *daß auch im serumfreien Organ Agglutination und Organbindung durch Mittelstück, die endliche Lyse durch Endstück bewirkt werde.* Es war denkbar, daß beispielsweise die Meerschweinchenleber im Durchströmungsversuch an die kreisenden sensibilisierten Blutkörperchen Mittelstück abgibt, die nun entweder zusammengeballt und dann rein mechanisch in den feineren Capillaren zurückgehalten werden oder aber auf Grund einer physikalisch-chemischen Zustandsänderung, für welche die Agglutination der Blutkörperchen untereinander nur den sinnfälligen Ausdruck bildet, auch mit den Endothelzellen leichter verkleben. Es war endlich möglich, daß im Anschluß an die so erfolgte Organbindung vom Organ geliefertes Endstück alsdann die Auflösung der roten Blutkörperchen herbeiführt.

[1]) *Otto Olsen*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **33**, 283. 1921.

Eigene Versuche.

Das Studium der Komplementwirkung serumfreier Organe wurde an der Hammelmilz fortgesetzt. Wir folgten hier dem Rat von Herrn Professor *Hahn*, der uns empfohlen hat, vor allem die Frage zu entscheiden, ob die an der Meerschweinchenleber beobachteten Erscheinungen für dieses Organ spezifisch waren, oder ob auch andere Organe, in erster Linie die Milz, deren Rolle im Ablauf der Immunitätsvorgänge besondere Beachtung beansprucht, ein ähnliches Verhalten zeigten. Aus technischen Gründen wurde gerade die Hammelmilz gewählt, die sich für den Durchströmungsversuch als besonders geeignet erwies[1]). Hier ermöglichte nun auch das besondere Verhalten der Hammelmilz eine weitere Analyse der vom Organ ausgehenden Komplementwirkung.

Leitet man durch die serumfreie Hammelmilz im künstlichen Kreislauf eine 5–10proz. Suspension von Hammelblutkörperchen, die mit hammelblutlösendem Amboceptor in einer Konzentration beladen sind, die wohl Hämolyse, aber innerhalb der Versuchsdauer keine Agglutination herbeiführt, so tritt das *Organbindungsphänomen fast augenblicklich auf*. Nach spätestens 5 Minuten, weit rascher also als bei der Meerschweinchenleber erscheint die kreisende Flüssigkeit klar und farblos. *Eine Auflösung* der gebundenen Blutkörperchen *bleibt aber aus*, die durchströmende Flüssigkeit ist selbst nach 2–3stündiger Durchströmung farblos oder höchstens schwach gelblich gefärbt.

Nach unseren eingangs erörterten Vorstellungen konnte das Auftreten der Organbindung in der Hammelmilz auf dem Vorhandensein von Mittelstück, das Fehlen lytischer Eigenschaften auf dem Fehlen von Endstück beruhen.

Wir suchten nun zunächst Mittel- und Endstückgehalt von Extrakten aus Hammelmilz in Reagensglasversuchen zu ermitteln. Diese wurden aus einer serumfreien Hammelmilz hergestellt, in der nach Durchleitung von sensibilisierten Blutkörperchen das Phänomen der Organbindung nach wenigen Minuten aufgetreten war, ohne daß sich Hämolyse gezeigt hätte. Nach zweistündiger Durchströmung wurde das Organ zerkleinert und kleine Stücke alsdann im Mörser teils mit Wasser, teils mit physiologischer Kochsalzlösung verrieben. Es ergab sich, daß diese Extrakte weder mit Amboceptor beladene Blutkörperchen zu lösen, noch zusammen mit Mittelstück eine Lyse sensibilisierter Blutkörperchen herbeizuführen vermochten. *Es war in den Extrakten aus Hammelmilz also weder Gesamtkomplement noch Endstück in nachweisbaren Mengen vorhanden.* Wohl aber gelang eine Auflösung sensibilisierter

[1]) *Emil v. Skramlik*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **194**, 118. 1922.

Blutkörperchen, wenn Gemische von *Milzextrakt und Endstück* auf diese einwirkten. Im Organextrakt *mußte demnach Mittelstück vorhanden* sein, das gemeinsam mit dem künstlich zugefügten Endstück Komplementfunktion ausübte. Da die Milz nach der erfolgten gründlichen Durchspülung mit Ringerlösung als serumfrei anzusehen war, so konnte *das nachgewiesene Mittelstück nur aus dem Organ selbst stammen* (Tafel I).

Tabelle I.

Hämolyse von 1,0 ccm 10fach sensibilisierter Hammelblutkörperchen (5%) bei einem Gesamtvolumen von 2,5 ccm.

I. durch fallende Mengen CO_2-Endstück 5fach verdünnt ccm	ohne sonstigen Zusatz	unter Zusatz von CO_2-Mittelstück 0,1	unter Zusatz von Milzextrakt 1,0
1,0	Spur	komplett	k
0,75	Spürchen	k	k
0,5	0	k	k
0,25	0	k	k
0,1	0	mäßig	fast komplett
0	0	0	0

II. durch fallende Mengen CO_2-Mittelstück 5fach verd. ccm	ohne sonstigen Zusatz	unter Zusatz von CO_2-Endstück 5fach verdünnt 0,5	unter Zusatz von Milzextrakt 1,0
1,0	0	k	0
0,75	0	k	0
0,5	0	k	0
0,25	0	k	0
0,1	0	kfk	0
0	0	0	0

Auch die vom Organ gebundenen sensibilisierten Blutkörperchen, die sich durch leichtes Aufschütteln von Organstückchen in Kochsalzlösung leicht und fast frei von Organzellen suspendieren ließen, lösten sich in diesen Versuchen bei Zusatz von Endstück. Das konnte ebenfalls nur auf ihrem Gehalt an Mittelstück beruhen, das vom Organ geliefert worden war.

Wenn nun die Hämolyse im Durchströmungsversuch bei der Durchleitung von sensibilisierten Hammelblutkörperchen durch die Hammelmilz ausbleibt, so konnte das Vorhandensein von Mittelstück in der Milz nur auf dem Fehlen von Endstück beruhen. Bei künstlicher Zufuhr von Endstück an die vom Organ gebundenen sensibilisierten Blutkörperchen mußte dann deren Auflösung eintreten.

In einem weiteren Durchströmungsversuch wurden daher durch eine Hammelmilz zunächst sensibilisierte Hammelblutkörperchen geleitet. Alsdann — eine Stunde nach vollständiger Bindung der Blutkörperchen ans Organ — wurde Endstück zugefügt. (In diesen und den folgenden

Versuchen kamen die Komponenten des Komplements nur in solchen Konzentrationen zur Verwendung, die allein ohne die korrespondierende Komponente keine Hämolyse, zusammen mit der korrespondierenden Komponente aber vollständige Auflösung von sensibilisierten Blutkörperchen bewirkten.) *Nach Zusatz des Endstücks zeigte die vorher farblose Durchströmungsflüssigkeit zunehmende Rotfärbung.* Diese erreichte nach Ablauf einer Stunde etwa den Grad, der bei vollkommener Hämolyse aller vom Organ gebundenen Blutkörperchen zu erwarten war. Damit war unsere Vermutung bestätigt, daß während des Durchströmungsversuchs von der Hammelmilz *zwar Mittelstück in Mengen, die für die Hämolyse hinreichten, an die sensibilisierten Blutkörperchen abgegeben wird. Endstück aber wird in Mengen, die zur Auflösung genügen, nicht geliefert. Nur künstliche Zufuhr von Endstück kann daher die Auflösung der gebundenen Blutkörperchen herbeiführen.*

Ein analoges Versuchsergebnis wurde erzielt, wenn *gleichzeitig* mit den sensibilisierten Blutkörperchen auch Endstück durch die Hammelmilz geleitet wurde.

Nun hätte man sich den Ablauf der Vorgänge, die zur Hämolyse führen, etwa so vorstellen können, daß das Organ an einzelne der kreisenden Blutkörperchen Mittelstück abgibt, die nun von dem sie umspülenden Endstück sogleich aufgelöst werden. Das ist aber *nicht* der Fall. Auch bei Vorhandensein von Endstück im Überschuß ging der Hämolyse wieder die Organbindung vorauf. Innerhalb von 5 Minuten nach Beginn des Versuchs waren alle Blutkörperchen aus dem Kreislauf durch die Milz abfiltriert. Dabei blieb die Durchströmungsflüssigkeit zunächst klar. Erst nach der erfolgten Bindung setzten Auflösungserscheinungen der Blutkörperchen ein, die sich im Verlauf einer Stunde vervollständigten.

In einem zur Kontrolle vorgenommenen Versuch wurden, wie der Vollständigkeit halber erwähnt sei, auch persensibilisierte, d. h. mit Mittelstück und Amboceptor versetzte Blutkörperchen durch die Hammelmilz geleitet. Hier zeigte sich erwartungsgemäß keine Hämolyse.

Die *Hammelmilz* zeigt also in ihrem Gehalt an Mittelstück und ihrem Mangel an Endstück *Unterschiede* gegenüber der *Meerschweinchenleber*, die ja die volle komplettierende Wirkung ausübt und also nicht nur Mittelstück, sondern außerdem auch Endstück enthalten muß. Ob es sich hier um allgemein geltende Unterschiede der beiden Organe, Milz und Leber, handelte, oder ob das verschiedene Verhalten der beiden Organe ihrem Ursprung von *verschiedenen Tierarten* zuzuschreiben war, mußte durch weitere Versuche an der *Hammelleber* entschieden werden.

Die *Durchströmungsversuche an der serumfreien Hammelleber* wurden mit der früheren Versuchsanordnung vorgenommen, die sich dem größe-

ren Volumen des Organes anpassen mußten. Gerade die Größenverhältnisse, die unter anderem auch einen größeren Aufwand an Reagenzien, namentlich an Komplement erforderten, erschwerten nicht nur die Durchführung, sondern auch die Deutung der Versuche. Wir heben aus diesen Versuchen daher nur die als sicher feststehende Beobachtung hervor, das daß *Organbindungsphänomen,* das sich in der Hammelmilz bereits nach fünf Minuten gezeigt hatte, in der Hammelleber *bei erheblich größerer Masse des Organs und Verwendung gleicher Mengen sensibilisierter Blutkörperchen erst nach einer Stunde* vollständig in Erscheinung trat. Wir haben für diese Tatsache nur die Erklärung, daß von der Hammelleber an die kreisenden Blutkörperchen geringere Mengen der Substanzen abgegeben werden, welche die Organbildung herbeiführen.

Es werden *von der Hammelleber also vermutlich geringere Mengen Mittelstück abgegeben als von der Milz.* Auflösungserscheinungen der gebundenen roten Blutkörperchen traten ebensowenig auf wie in der Hammelmilz. Wie dort ließ sich also Endstück in der Hammelleber nicht nachweisen. Auch das Hammelserum ist bekanntlich arm an Endstück. (In unseren Versuchen waren durchschnittlich 1,0 ccm des konzentrierten Hammelserums nötig, um 0,5 ccm persensibilierte, d. h. mit Mittelstück und Amboceptor versetzte Blutkörperchen zu lösen, während dazu 0,02 ccm Meerschweinchenserum genügte.) Das Verhalten des Hammelserums steht in dieser Beziehung also in Übereinstimmung mit dem Verhalten von Milz und Leber. Wir konnten zwar feststellen, daß im Durchströmungsversuch sowohl die Hammelleber als auch die Hammelmilz Mittelstück an die kreisenden Blutkörperchen abgibt. Über das Verhalten des Endstücks konnte aber Aufschluß nicht erhalten werden, weil dieses vom Hammel anscheinend überhaupt nur in geringen Mengen gebildet wird, die möglicherweise im Durchströmungsversuche dem Nachweis entgingen.

Nun weist zweifellos die Tatsache, daß Extrakte aus serumfreier Hammelmilz Mittelstück enthalten, und daß dieses auch im Durchströmungsversuch an kreisende Blutkörperchen abgegeben wird, auf einen *Vorrat dieses Organs an Mittelstück hin.* Ob es sich dabei um gespeicherte Mengen handelte, oder ob eine fortlaufende Produktion von Mittelstück im Sinne einer Sekretion vorliegt, vermögen wir durch diese Versuche noch nicht zu entscheiden.

Zusammenfassung.

Wässerige Extrakte aus serumfreier Hammelmilz enthalten Mittelstück. Im Durchströmungsversuch erfolgt zwar eine *Bindung* der im künstlichen Kreislauf strömenden sensibilisierten Blutkörperchen an das

serumfreie Organ, eine Auflösung der so gebundenen Blutkörperchen tritt aber *nicht* in Erscheinung. Es wird an die Blutkörperchen Mittelstück vom Organ abgegeben, auf dessen Einwirkung vermutlich das „Organbindungsphänomen" beruht. Es wird aber kein Endstück in einer für die Hämolyse hinreichenden Menge von der Milz geliefert, und nur bei künstlicher Zufuhr von Endstück durch den Kreislauf an die gebundenen Blutkörperchen werden diese gelöst. Ein analoges Verhalten zeigt die Hammelleber. Beide Organe weisen in ihrem Gehalt an Mittelstück und ihrem Mangel an Endstück Übereinstimmung mit den Eigenschaften des Hammelserums auf, das reichliche Mengen Mittelstück, aber nur spärlich Endstück enthält.

Über die Bildung der Citronen- und Oxalsäure in den Citromyces-Kulturen auf Zucker und das Verfahren zur quantitativen Bestimmung dieser Säuren.

Von

Wl. Butkewitsch.

(Aus der Landwirtschaftlichen Akademie Moskau, Petrowsko-Rasumowsko.)

(Eingegangen am 19. April 1922.)

Nachdem die Fähigkeit, aus Pepton und aus den Salzen verschiedener organischer Säuren, unter anderem auch aus denen der Citronensäure, Oxalsäure zu bilden, bei *Citromyces* nachgewiesen war[1]), trat die Frage nach den wechselseitigen Beziehungen zwischen Citronen- und Oxalsäure in den Kulturen dieser Pilze auf Zucker in den Vordergrund des Interesses dieser Zusammenhänge. Die Erforschung bildet den Gegenstand der weiter unten beschriebenen Versuche.

Zu diesem Zwecke war es notwendig, ein hinreichend sicheres und einfaches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Citronen- und Oxalsäure nebeneinander zu haben. Nach einigen vorläufigen Prüfungen hielt ich mich an die Methode, welche sich auf die ungleiche Löslichkeit der Calciumsalze in Säuren gründet. Das hier von mir angewandte Verfahren wurde entsprechend der Bedingungen ausgearbeitet, in denen man die Bestimmungen der Citronen- und Oxalsäure bei der Analyse der Kulturen ausführen mußte, die diese Säuren gewöhnlich als ihre Calciumsalze enthielten.

I. Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Citronen- und Oxalsäure.

Von der ungleichen Löslichkeit der Calciumsalze ausgehend, konnte man zur Trennung der Citronen- und Oxalsäure voneinander zwei Wege einschlagen: 1. das Extrahieren der Mischung ihrer Calciumsalze durch Säure bei Bedingungen, unter denen nur Calciumcitrat in Lösung übergeht; 2. die Oxalsäure, nach dem Auflösen beider Salze in Salzsäure, durch teilweise Neutralisierung als Calciumsalz abzuscheiden. Als auflösende und die Fällung hemmende Säuren wurden Salz- und Essigsäure angewandt.

---

[1]) Vgl. *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **129**, 464. 1922.

Die Grundlage zur Feststellung der Bedingungen, welche die oben genannte Auflösung und Fällung bewirken, gaben zwei Versuchsreihen. In einer (I) dienten als Ausgangsmaterial die Calciumsalze der Citronen- und Oxalsäure, in den anderen (II) die Lösungen dieser Säuren, denen Calciumcarbonat in einigem Übermaße zugesetzt wurde.

1. Versuche mit den Calciumsalzen der Oxal- und Citronensäure.

Dieser Serie gehören drei Versuche an: die Bestimmung a) der Oxalsäure im Calciumoxalat, b) der Citronensäure im Calciumcitrat und c) der einen so wie auch der anderen Säure im Gemisch dieser Salze.

a) *Calciumoxalat*, 0,5 g Oxalat wurden 25 ccm Wasser und 6 ccm 4,5 proz. Salzsäure zugesetzt. Die letztere enthielt soviel HCl (ca. 0,25 g), daß sie dem zur Analyse genommenen Salz beinahe äquivalent war. Der Niederschlag löste sich auch beim Kochen nicht auf. Der erhitzten Flüssigkeit wurden noch 3 ccm 4,5 proz. und 3 mal je 1 ccm 20 proz. Salzsäure allmählich bis zur vollständigen Auflösung des Niederschlages zugesetzt. Insgesamt wurde 1 g HCl angewendet. Die Gesamtmenge der Flüssigkeit betrug 35 - 40 ccm, und sie enthielt ca. 2,5% HCl. Der erhitzten Flüssigkeit wurde Natriumacetat in einer der zugesetzten Salzsäure äquivalenten Menge, d. h. also 16 ccm 25 proz. Lösung (4 g $NaC_2H_3O_2 \cdot 3\,H_2O$), portionsweise zugegeben; schon die 1. Portion von 5 ccm gab einen reichlichen Niederschlag. Nach Absetzen wurde der Niederschlag abfiltriert und getrocknet. Das Wägen desselben gab 0,479 g. Beim Titrieren des in Schwefelsäure gelösten Niederschlages mit Kaliumpermanganatlösung (Titer 0,00903 g Oxalsäure auf 1 ccm; beim Titrieren wurden 32,6 ccm verbraucht) wurden 0,2962 g oder 61,8% Oxalsäure ($C_2O_4H_2$) in demselben gefunden[1]).

b) *Calciumcitrat*. 0,5 g Citrat wurden in 20 ccm Wasser und 5 ccm 4,5 proz. Salzsäure (die Menge HCl, ca. 0,2 g, ist beinahe dem zur Analyse genommenen Salze äquivalent) ohne Erhitzen gelöst. In der erhitzten Flüssigkeit wurden 4 ccm 25 proz. Natriumacetatlösung, d. h. 1 g $NaC_2H_3O_2 \cdot 3\,H_2O$, hinzugetan — die Menge, welche der zum Auflösen verwandten Salzsäure äquivalent ist. In der nach dem Erhitzen sich selbst überlassenen Flüssigkeit schied sich ein bedeutender Niederschlag aus. Darauf wurde Salzsäure bis zum vollständigen Auflösen des vom Natriumacetat sich bildenden Niederschlags und Natriumacetat in einer der zugesetzten Salzsäure äquivalenten Menge der erhitzten Flüssigkeit portionsweise aufeinanderfolgend und abwechselnd zugesetzt, solange bis ein Zusatz von Natriumacetat schon keine Bildung des Niederschlages mehr hervorrief. Auf diese Weise wurde insgesamt 1,2 g HCl verbraucht. Die Gesamtmenge der Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade durch Abdampfen etwas eingeengt und durch Ammoniak (bis zur schwach sauren Reaktion) neutralisiert. Nach dem Kochen wurde der dabei sich bildende Niederschlag des Calciumcitrats abfiltriert und bei 100—105° getrocknet. Er wog 0,358 g.

c) 0,5 g *Calciumoxalat* und 0,5 g *Calciumcitrat* wurden 45 ccm Wasser und 11 ccm 4,5 proz. HCl, darauf nach Erhitzen der Flüssigkeit noch 5 ccm 20 proz. Salzsäure (in Portionen von je 1 ccm) bis zur vollständigen Lösung des Niederschlages zugesetzt. Der bis zum Kochen erhitzten Lösung, die ca. 2,5% HCl enthielt und das Volumen 65 ccm hatte, wurde Natriumacetat in einer der zum Auflösen verbrauchten Salzsäure äquivalenten Menge (25 ccm 25 proz. Lösung, d. h. 6,25 g $NaC_2H_3O_2 \cdot 3\,H_2O$) zugetan. Der dabei sich bildende Niederschlag von Calciumoxalat wurde nach Absetzen abfiltriert und getrocknet. Das Gewicht des trockenen

[1]) Calciumoxalat ($C_2O_4Ca \cdot H_2O$) enthält 61,64% Oxalsäure ($C_2O_4H_2$).

Niederschlages ergab 0,482 g. Beim Titrieren mit Permanganatlösung [verbraucht 32,9 ccm, Titer ist oben angegeben, vgl. a)] wurden 0,2971 g oder 61,6% Oxalsäure im Niederschlage gefunden.

Das Filtrat wurde bis zum Volumen 40—50 ccm durch Abdampfen eingeengt und durch Zusatz von Ammoniak bis zur schwach sauren Reaktion neutralisiert. Der Niederschlag des Calciumcitrats wurde nach dem Kochen abfiltriert und getrocknet. Er hatte das Gewicht von 0,365 g.

Im folgenden geben wir eine Zusammenstellung der Ergebnisse der drei soeben beschriebenen Versuche.

Tabelle I.

	Versuch *a*	Versuch *b*	Versuch *c*	
	Ca-oxalat g	Ca-citrat g	Ca-oxalat g	Ca-citrat g
genommen	0,500	0,500	0,500	0,500
gefunden	0,479	0,358	0,482	0,365
Differenz	0,021	0,142	0,018	0,135

Es gelingt also bei den Bedingungen, unter denen die Bestimmungen der Oxal- und Citronensäure ausgeführt wurden, die Oxalsäure als Calciumsalz auszuscheiden ohne die Citronensäure mitzufällen. Für Calciumoxalat stimmen die bei der Analyse erhaltenen Werte mit der genommenen Menge gut überein. Eine größere Divergenz gibt Calciumcitrat, welches bekanntlich eine bedeutend größere Löslichkeit in Wasser als Calciumoxalat besitzt.

2. Versuche mit Citronen- und Oxalsäure + Calciumcarbonat.

Bei diesen Versuchen wurden die Bestimmungen der Citronen- und Oxalsäure unter Bedingungen ausgeführt, die sich denjenigen nähern, welche in den der Analyse unterliegenden Kulturen vorhanden waren. Als Ausgangsmaterial dienten die Lösungen der Säuren, denen Calciumcarbonat in derselben Menge, wie auch den Kulturen bei unseren Versuchen mit Pilzen, zugesetzt wurde. Unter solchen Bedingungen wurden zwei Versuche durchgeführt. Zwei gleichen Portionen von Calciumcarbonat zu je 3 g wurden 25 ccm Wasser, 15 ccm 20proz. Citronensäure- (3 g) und 10 ccm 5proz. Oxalsäurelösung (0,5 g) zugesetzt[1]). Dieses im *Koch*schen Sterilisator erhitzte Gemisch diente in beiden Versuchen als Ausgangsmaterial für die Analyse. In einem (*A*) wurde die Trennung des Calciumoxalats durch Extrahieren des Gemisches unter Bedingungen, bei denen nur Calciumcitrat in Lösung übergehen konnte, erreicht; im anderen (*B*) — dadurch, daß die Oxalsäure, nachdem die

[1]) Dieses Gemisch enthält, auf die angewandten Säuren berechnet, einen Überschuß von $CaCO_3$. Zur Bildung ihrer Calciumsalze sind nur ca. 2,3 g $CaCO_3$ notwendig.

Calciumsalze des Gemisches in Salzsäure vollständig aufgelöst waren, als Calciumoxalat, bei den die Fällung der Citronensäure ausschließenden Bedingungen, aus der Lösung niedergeschlagen wurde. — Außerdem wurde in jeder der für die Versuche gebrauchten Lösungen die in denselben enthaltene Säure nach dem gewöhnlichen Verfahren, als Calciumsalz, bestimmt (Kontrollbestimmungen *C* und *D*).

A. Zum obengenannten Gemisch wurden 50 ccm 4,5 proz. Salzsäure (d. h. 2,25 g HCl — eine Menge, die dem genommenen Calciumcarbonat beinahe äquivalent ist) zugesetzt. Nach dem Erhitzen und Absetzen wurde der unaufgelöst gebliebene Niederschlag abfiltriert und getrocknet: 0,5655 g. Nach dem Titrieren mit Chamäleonlösung [verbraucht 38,4 ccm; Titer ist oben, beim Versuch a) angegeben] enthielt der Niederschlag 0,3468 g oder 61,3% wasserfreie Oxalsäure ($C_2O_4H_2$). Bei der Berechnung der wässerigen Säure ($C_2O_4H_2 \cdot 2\,H_2O$) erhalten wir 0,4880 g — einen Wert, welcher der Menge der genommenen Oxalsäure (0,5 g) nahekommt.

Die vom Calciumoxalat abfiltrierte Flüssigkeit wurde erhitzt und beim Kochen durch Ammoniak neutralisiert. Der gebildete Niederschlag des Calciumnitrats wurde abfiltriert. Das erhaltene Filtrat wurde auf dem Wasserbade eingeengt und der dabei sich noch bildende geringe Niederschlag abfiltriert. Beide auf diese Weise erhaltenen Niederschläge wurden getrocknet und gewogen. Sie wogen 1, 3,658 g + 2, 0,163 g = 3,821 g. Diesem Gewichte des Calciumsalzes entsprechen 2,865 g Citronensäure[1]) (genommen 3 g).

B. Dem zur Analyse genommenen Gemisch (demselben wie auch im Versuch *A*) wurden 50 ccm 4,5 proz. und darauf noch aufeinanderfolgend 10 ccm (beim Erhitzen blieb noch ein ungelöster Rückstand) und 5 ccm 20 proz. Salzsäure zugesetzt, worauf der Niederschlag ohne Rückstand in Lösung überging. Die Gesamtmenge der zugesetzten Salzsäure (HCl) machte 5,25 g aus. Darauf wurden 40 ccm 25 proz. Natriumacetatlösung nach und nach portionsweise zu je 10 ccm, bis zum Aufhören der Niederschlagsbildung, der erhitzten Flüssigkeit zugesetzt. Der abgesetzte Niederschlag wurde abfiltriert und getrocknet: 0,5635 g. Nach dem Titrieren mit Chamäleonlösung (verbraucht 38,3 ccm; Titer ist oben angegeben) enthielt der Niederschlag 0,3458 g (61,4%) wasserfreie ($C_2O_4H_2$) oder 0,4842 g wässerige ($C_2O_4H_2 \cdot 2\,H_2O$) Oxalsäure (genommen 0,5 g).

Aus der vom Calciumoxalat abfiltrierten Flüssigkeit wurde Calciumcitrat, ebenso wie auch im vorigen Versuche *A*, ausgeschieden. Die erhaltenen Niederschläge wogen 1, 3,7885 g + 2, 0,0550 g = 3,8435 g, was 2,883 g Citronensäure entspricht.

C. Von der in den vorigen Versuchen gebrauchten Oxalsäurelösung wurden 10 ccm genommen, mit 25 ccm Wasser verdünnt und mit Ammoniak neutralisiert. In dieser Lösung wurde die Oxalsäure nach dem gewöhnlichen Verfahren durch Fällung mit Calciumacetat bestimmt. Der erhaltene Niederschlag wog 0,573 g. Nach Titrieren mit Chamäleon (38,9 ccm) enthielt er 0,3513 g (61,3%) $C_2O_4H_2$ oder 0,4918 g $C_2O_4H_2 \cdot 2\,H_2O$.

D. Es wurden 15 ccm 20 proz. Citronensäurelösung (wie auch in den Versuchen *A* und *B*), 25 ccm Wasser und 2,5 g Calciumcarbonat genommen. Nach dem Erhitzen dieses Gemisches wurden 40 ccm 4,5 proz. Salzsäure (d. h. 1,8 g HCl — die Menge, welche dem genommenen $CaCO_3$ äquivalent ist) demselben zugesetzt. Aus der auf diese Weise erhaltenen Lösung wurde die Citronensäure ebenso wie

[1]) Der Gehalt an Citronensäure ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) in ihrem Calciumsalz macht beinahe $^3/_4$ seines Gewichtes aus.

in den Versuchen *A* und *B* als Calciumsalz ausgeschieden. Die erhaltenen Niederschläge wogen 1, 3,728 g + 2, 0,118 g = 3,846 g, was 2,8845 g Citronensäure entspricht.

Die bei den Versuchen *A*, *B*, *C* und *D* erhaltenen Resultate sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle II.

	Versuch *A*		Versuch *B*		Versuch *C*	Versuch *D*
	Oxalsäure g	Citronens. g	Oxalsäure g	Citronens. g	Oxalsäure g	Citronens. g
genommen	0,500	3,000	0,500	3,000	0,500	3,000
gefunden	0,488	2,865	0,484	2,883	0,492	2,885
Differenz	0,012	0,135	0,016	0,117	0,008	0,115

Aus den in der Tabelle II angeführten Angaben sieht man, daß sowohl das eine, wie auch das andere der von uns versuchten Verfahren zur Trennung der Oxal- und Citronensäure voneinander völlig befriedigende Resultate ergibt.

Bei der Analyse der Kulturen, welche Citronen- und Oxalsäure als Calciumsalze enthielten, wurde zuerst das Extrahieren mit schwacher Salzsäure (2—2,5%) unter Bedingungen, bei denen nur Calciumcitrat in Lösung übergeht, angewandt, darauf wurde zur Auflösung des Calciumoxalats der bei der ersten Extraktion ungelöst gebliebene Rückstand mit stärkerer Salzsäure (5—10%) gekocht. In den auf diese Weise erhaltenen Lösungen wurde die Citronen- und Oxalsäure nach den üblichen Verfahren bestimmt, indem sie als Calciumsalze ausgeschieden wurden.

Wenn die Citronen- und Oxalsäure sich nicht als Kalk- sondern als lösliche Alkalisalze in den Kulturen befanden, wurden sie gewöhnlich zusammen durch Umwandlung in die Calciumsalze mittels Calciumacetats aus der Lösung ausgeschieden. Nach der Bestimmung des Gesamtgewichtes ihrer Calciumsalze wurde der Niederschlag in Salzsäure aufgelöst und aus dieser Lösung die Oxalsäure als Calciumsalz mittels Natriumacetat von neuem niedergeschlagen. Auf diese Weise wurde die Oxalsäure abgetrennt und bestimmt, und darauf der Gehalt der Citronensäure im untersuchten Niederschlag aus der Differenz (Gesamtgewicht der Calciumsalze — Oxalatgewicht) ermittelt.

In dem ersten der Versuche[1]), welche zur Aufgabe hatten, die wechselseitige Beziehung der Citronen- und Oxalsäure in den *Citromyces*-Kulturen auf Zucker klar zu stellen, wurden die letzteren bei relativem Stickstoffmangel angesetzt, d. h. unter der Bedingung, welche nach den

[1]) Diese Versuche wurden im Sommer 1918 angestellt.

Angaben von *Mazé* und *Perrier*[1]), die später von anderen Autoren[2]) bestätigt wurden, als besonders günstig für die Anhäufung der Citronensäure erscheinen. Nach den Versuchen von *Mazé* und *Perrier* und von *Buchner* und *Wüstenfeld*, so wie auch nach den früheren von *Wehmer*, erreicht die Ausbeute dieser Säure in den *Citromyces*-Kulturen mit Calciumcarbonat 50% des in ihnen sich befindenden Zuckers. In solchen Kulturen haben die genannten Autoren keine anderen Produkte außer Citronensäure und Kohlendioxyd nachgewiesen.

II. Versuch A—B: Kulturen auf Rohrzucker mit Calciumcarbonat und mit Ammoniumnitrat oder Bohnenabsud als Stickstoffquelle.

In diesem Versuch wurden zwei Lösungen als Substrat für die Kulturen gebraucht. In der einen dienten Ammoniumnitrat und das gewöhnliche Salzgemisch (KH_2PO_4, $MgSO_4$, Fe_2Cl_6 und $ZnSO_4$) als Stickstoff- und Nährsalzquelle, in der anderen — ein Bohnenabsud (von der weißen Phaseole), welcher nach *Mazé*[3]) hergestellt wurde; jedoch wurden die quantitativen Verhältnisse zwischen Bohnen- und Extraktionswasser etwas modifiziert, und zwar wurden 150 g Bohnen (statt 100 g nach *Mazé*) auf 1 l Wasser genommen. Als Kohlenstoffquelle diente in beiden Lösungen Rohrzucker[4]).

Die Zusammensetzung der Nährlösungen:

	A		*B*
Wasser +	Rohrzucker	10%	Bohnenabsud + Rohrzucker . . 10%
	NH_4NO_3	0,1%	
	Salze ($ZnSO_4$ – 0,01%)	0,1%	

Für die Kulturen wurden folgende Pilze genommen: *Citromyces glaber*, *C. Pfefferianus*, *C. citricus*, *Penicillium glaucum*, drei *Citromyces*-Arten, die im Moskauer bakteriologischen Laboratorium isoliert wurden und durch die Buchstaben α, β, und γ bezeichnet sind, und außerdem vier von mir selbst isolierte Pilze, und zwar zwei *Citromyces*-Arten, von denen die eine aus 20 proz. Lösung der Citronensäure, *Citrom C*, und die andere aus gesättigter Lösung der Bernsteinsäure, *Citrom. s*, isoliert wurde, und zwei Pilze mit einem makroskopischen Aussehen von *Penicillium*, von denen der eine von verschimmeltem Brot, *Pen. I*, und der andere von verschimmelter Wurst, *Pen.* 2, isoliert wurde[5]).

---

[1]) *P. Mazé* et *A. Perrier*, Ann. de l'inst. Pasteur **18**, 553. 1904.

[2]) *Ed. Buchner* und *H. Wüstenfeld*, diese Zeitschr. **17**, 395. 1909. — *R. O. Herzog* und *A. Polotzky*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**, 125. 1909.

[3]) *P. Mazé* et *A. Perrier*, l. c.

[4]) Im gegebenen Falle wurde Rohrzucker als einziger Zucker, welcher in der für Anstellung dieses Versuchs hinreichenden Quantität zu meiner Verfügung stand, gebraucht.

[5]) Die 4 letzten Pilze sind in morphologischer Hinsicht bisher noch nicht näher untersucht; die Benennungen *Citromyces* und *Penicillium* können ihnen daher nur vermutungsweise beigelegt werden.

Alle in diesem Versuch gebrauchten Pilze wurden zuerst auf 12 proz. Citronensäurelösung kultiviert. Das wurde mit Rücksicht auf Literaturangaben[1]) gemacht, nach denen eine solche Kultur die Fähigkeit des Pilzes, diese Säure zu bilden, bei der nachfolgenden Kultur auf Zucker steigert. Für *Citrom. glaber* wurden auch die ergänzenden parallelen Kulturen mit Impfung vom ursprünglichen Pilze, welcher der Kultur auf Citronensäure nicht unterworfen wurde, aufgestellt.

Für jede Kultur wurden je 50 ccm Nährlösung genommen. Nach der Impfung wurden alle Kulturen bei Zimmertemperatur, die im Laufe des Versuches zwischen 24—27° schwankte, stehengelassen.

Zehn Tage nach der Impfung, als sich eine hinreichend starke Pilzdecke in den Kulturen gebildet hatte, wurden je 3 g durch Erhitzen sterilisiertes Calciumcarbonat allen Kulturen hinzugesetzt. Dabei wurde ein Aufbrausen infolge der Ausscheidung von Kohlendioxyd nur in den Kulturen *Pen.* 1 und *Pen.* 2 beobachtet.

Zu dieser Zeit war die Entwicklung der verschiedenen Pilze auf den Lösungen *A* und *B* ungleich. In den Kulturen von *Citrom. glaber, C. citricus, Citrom. C.* und *Citrom. s.* waren die Pilzdecken auf der Lösung *B* sichtlich besser entwickelt als auf *A*; bei den übrigen Pilzen zeigte sich das Umgekehrte (in den Kulturen von *Pen.* 2 war dieser Unterschied schwach ausgeprägt). Dieser Unterschied glich sich in der Folge allmählich aus und zum Schlusse des Versuches war er wenig bemerkbar.

Nach 50 Tagen wurden die Kulturen zur Analyse gebracht, nachdem sie im *Koch*schen Sterilisator abgetötet worden waren. Die Analyse wurde nach folgendem Verfahren ausgeführt.

Der zur Analyse genommenen Kultur wurden 50 ccm 4,5 proz. Salzsäure[2]) nach und nach portionsweise beim Erhitzen hinzugesetzt. Nach halbstündigem Kochen wurde die Lösung mit der Pilzdecke stehengelassen und nach dem Abkühlen durch einen gewogenen Filter abfiltriert (Filtrat I). Darauf wurde die Pilzdecke auf das Filter übertragen und nach Auswaschen mit demselben getrocknet und gewogen. Auf diese Weise wurde das Gesamtgewicht der Pilzdecke und des sich in der Kultur befindenden und ungelöst gebliebenen Calciumoxalats[3]) bestimmt. Um das letztere zu isolieren, wurde der Niederschlag zusammen mit dem Filter mit 5 proz. siedender Salzsäure (50 ccm) extrahiert. Die Lösung wurde filtriert und die Oxalsäure aus dem Filtrat als Calciumsalz ausgeschieden. Nachdem die Menge des sich in der Kultur befindenden

[1]) Vgl. *Ed. Buchner* und *H. Wüstenfeld*, l. c.

[2]) Die Menge von HCl ist dem der Kultur zugesetzten Calciumcarbonat beinahe äquivalent.

[3]) Das in den Kulturen befindliche Calciumoxalat lagerte sich hauptsächlich in der Pilzdecke ab.

Calciumoxalats festgestellt war, wurde das Pilzdeckengewicht nach der Differenz [(Pilzdecke + Oxalat) — Oxalat] bestimmt. — Die Citronensäure wurde im Filtrat 1 bestimmt, nachdem es durch Zusatz von Natriumacetat auf Abwesenheit der Oxalsäure geprüft war. Dieses Filtrat wurde auf dem Wasserbade auf 40—50 ccm eingeengt und mit Ammoniak neutralisiert. Der dabei gebildete Niederschlag wurde nach Erhitzen abfiltriert, getrocknet und gewogen.

Alle Calciumoxalatniederschläge wurden nach Auflösung in Schwefelsäure mit Chamäleon titriert und dadurch identifiziert.

Die Identifizierung der Citratniederschläge stützte sich in den meisten Fällen teils auf ihr charakteristisches (makro- und mikroskopisches) Aussehen, teils auf die Reaktion von *Denigés*[1]). Aus den Niederschlägen, die von den Kulturen des *Citrom. glaber* und *Pen.* 2 stammten, wurde die Citronensäure auch als solche ausgeschieden und durch Filtrieren mit $^1/_{10}$ N-Barytlösung identifiziert[2]).

Fast in allen Kulturen wurde die Oxalsäure neben der Citronensäure, in einigen Fällen in ziemlich bedeutender Menge, nachgewiesen.

Bei der Analyse der Kulturen von *Penicillium glaucum* wurde die Ausscheidung des für das Citrat charakteristischen Niederschlages nicht beobachtet. Der sich dabei bildende geringe Niederschlag hatte das Aussehen von braunen Flocken. Nach der Befreiung der Flüssigkeit von diesem Niederschlage durch Filtrieren schied sich im Filtrat nur bei lange dauerndem Stehen ein geringer krystallinischer Niederschlag als Kruste am Boden des Glases aus. Nach seinem Aussehen unter dem Mikroskop war dieser Niederschlag dem Calciumcitrat ähnlich, und, in Schwefelsäure gelöst, gab er deutlich die Reaktion von *Denigés*. Also scheint auch *Penic. glaucum* die Fähigkeit zur Bildung der Citronensäure zu besitzen, die Bedingungen für ihre Anhäufung sind aber in seinen Kulturen weniger günstig als in denen der übrigen in dieser Versuchsreihe geprüften Pilze.

Die nachfolgende Tabelle stellt eine Zusammenfassung der bei den Kulturanalysen erhaltenen Resultate dar.

Zur Zeit der Analyse war der Zucker in allen Kulturen verbraucht. Die relativen Mengen der in den Kulturen gefundenen Citronensäure

[1]) *G. Denigés*, Ann. de Chim. et de Phys. (VII) **18**, 382. 1899.

[2]) Die aus den Kulturen ausgeschiedenen Citratniederschläge wurden mit Schwefelsäure bearbeitet. Nach dem Kochen wurde die Lösung durch Filtration von Calciumsulfat abgetrennt, durch Abdampfen auf dem Wasserbade stark eingeengt und stehengelassen. Die beim Stehen auskrystallisierende Citronensäure wurde von der Mutterlauge abgetrennt, im Exsiccator getrocknet und durch $^n/_{10}$-Barytlösung mit Phenolphthalein als Indicator titriert. Beim Titrieren der Citronensäurepräparate, die aus den Kulturen von *Citrom. glaber* und *Pen.* 2 erhalten waren, wurden entsprechend 14,2 und 14,4 ccm $^n/_{10}$-Barytlösung auf 100 mg der genommenen Substanz verbraucht. Theoretisch müßten für Citronensäure 14,3 ccm verbraucht werden.

Tabelle A—B.

		Pilzdecke (ohne Calcium-oxalat) g	Calcium-citrat g	Calcium-oxalat g	Beim Titrieren des Ca-Oxalats mit Permanganat (Titer = 0,00903 g Oxalsäure auf 1 ccm) Permang. verbr. ccm	$C_2O_4H_2$ gefunden in g	in %*)
Citrom. glaber (ursprüngl. Kultur)	A	1,0495	1,0005	0,1820	12,5	0,11287	62,0
	B	0,9510	0,5405	0,2990	20,5	0,18511	61,9
Citrom. glaber (Kultur auf Citronens.	A	0,9615	1,0370	0,1945	13,6	0,12281	63,1
	B	1,0140	0,3225	0,2830	19,3	0,17428	61,6
Citrom. Pfefferiams	A	0,7510	0,5675	0	—	—	—
	B	1,0660	1,4595	0,1085	7,4	0,06682	61,6
Citrom. citricus	A	0,6715	0,0385	0,2740	18,6	0,16796	61,3
	B	0,9900	0,5020	0,0910	6,2	0,05599	61,5
Citrom. α	A	0,9060	1,3540	0,1055	7,2	0,06502	61,6
	B	1,1770	0,7380	0,4920	33,6	0,30341	61,7
Citrom. β	A	0,9995	1,1280	0,0995	6,8	0,06140	61,7
	B	1,3345	0,3910	0,2720	18,6	0,16796	61,7
Citrom. γ	A	0,7640	0,9940	0,0985	6,8	0,06140	62,3
	B	0,7330	0,5370	0,5670	39,0	0,35217	62,1
Citrom. c	A	0,9195	1,1730	0,0965	6,7	0,06050	62,7
	B	0,9180	0,6520	0,3075	20,8	0,18782	61,1
Citrom. s	A	0,8930	1,2650	Spuren	—	—	—
	B	0,9020	0,4675	0,4930	33,7	0,30431	61,7
Penic. I	A	0,7300	0,3745	0,0800	5,5	0,04966	62,1
	B	0,8190	1,3620	0,0430	3,0	0,02709	63,0
Penic. II	A	0,6070	1,5690	0,0480	3,3	0,02989	62,1
	B	0,8350	1,7205	0,0230	1,6	0,01445	62,8
Penic. glaucum	A	0,7990	ein wenig	0	—	—	—
	B	0,5740	nicht nachgewiesen	0	—	—	—

*) Calciumoxolat ($C_2O_4Ca \cdot H_2O$) enthält 61,64% Oxalsäure ($C_2O_4H_2$).

sind verhältnismäßig unbedeutend und nirgends nähern sie sich dem Werte, der für die maximale Ausbeute derselben von *Mazé* und anderen Autoren angegeben wird. Die höchste Menge der Citronensäure, welche wir in den Kulturen von *Pen. 2* finden, macht nur 25% des verbrauchten Zuckers aus. Das scheint wenigstens teilweise durch verhältnismäßig späten Zusatz von Calciumcarbonat zu den Kulturen bedingt zu werden, da zu dieser Zeit ein bedeutender Teil des Zuckers schon verbraucht war. Dafür spricht unter anderem auch die Tatsache, daß die Kulturen, in denen die Pilzdecken zur Zeit des Calciumcarbonatzusatzes stärker entwickelt waren, zum Schlusse des Versuches weniger Citronensäure enthielten, als diejenigen, welche in der Mycelentwicklung zurückblieben. Das Anhäufen der freien Citronensäure fand in irgendwelcher bedeutenden Menge, soviel man nach dem Aufbrausen der Flüssigkeit beim Calciumcarbonatzusatz urteilen konnte, außer in den Kulturen von *Pen. 1* und *Pen. 2*, wie das schon oben erwähnt ist, nicht statt. Das war wahr-

scheinlich von der Temperatur abhängig, die während des Versuches von Zeit zu Zeit 27° erreichte[1]).

Was die relativen Mengen der Citronen- und Oxalsäure anbetrifft, so kann man ein umgekehrtes Verhältnis zwischen ihnen in den meisten Fällen nachweisen: mit der Abnahme der Menge der ersteren nimmt die der letzteren zu und umgekehrt. Diese Korrelation findet ihre Erklärung in der Bildung des Oxalats auf Kosten des Citrats, d. h. in der Umwandlung des letzteren, die *Wehmer* annahm, nachdem er die Anwesenheit der Oxalsäure in den älteren Kulturen von *Citromyces* nachgewiesen hatte.

Die Citronensäure scheint also ein Zwischenprodukt in der Stoffumwandlung, die vom Zucker zur Oxalsäure führt, darzustellen. Weiter entsteht die Frage, ob sie ein normales Produkt in der Stoffumwandlung bei den Pilzen, bei denen ihr Nachweis gelang, bildet, oder ihr Entstehen, wie einige annehmen, im Zusammenhange nur mit außerordentlichen anormalem Existenzbedingungen der zu ihrer Bildung fähigen Organismen steht.

An die Lösung dieser Frage kann man nur durch die nähere Feststellung der Bedingungen für die Bildung und den Verbrauch der Citronensäure herantreten. Aus diesen zwei Faktoren setzt sich der Vorgang zusammen, welcher die mehr oder weniger bedeutende Anreicherung oder auch das vollständige Fehlen derselben in den Kulturen herbeiführen kann. Einiges Material für die Feststellung dieser Bedingungen geben unsere weiteren Versuche, deren Ergebnisse wir in einer besonderen Abhandlung erörtern werden.

Zusammenfassung.

Zur quantitativen Trennung und Bestimmung der Citronen- und Oxalsäure kann man die ungleiche Löslichkeit ihrer Calciumsalze in Säuren benutzen.

Die Trennung des citronen- und oxalsauren Calciums voneinander ist auf zwei Wegen zu erreichen, und zwar 1. durch Extrahieren des Gemisches der beiden Salze mit schwacher Salzsäure bei Bedingungen, die nur die Auflösung des Calciumcitrats zulassen, und 2. durch vorhergehende Auflösung beider Salze in Salzsäure und durch Ausscheidung der Oxalsäure als Calciumsalz aus der so erhaltenen Lösung bei Bedingungen, welche die Möglichkeit der Fällung des Calciumcitrats ausschließen.

Falls die Citronen- und Oxalsäure nicht als Kalk-, sondern als lösliche Alkalisalze vorliegen, so werden sie durch Umwandlung in Calciumsalze aus der Lösung zusammen ausgeschieden und darauf durch eins der oben genannten Verfahren voneinander getrennt.

[1]) Die Kulturen wurden im Sommer bei Zimmertemperatur angesetzt.

In den lange gezüchteten Kulturen auf 10 proz. Rohrzuckerlösung mit Calciumcarbonat bei relativem Stickstoffmangel (0,1% NH_4NO_3 oder Bohnenabsud nach *Mazé*) häufen die Pilze, welche die Fähigkeit zur Bildung der Citronensäure besitzen, neben der letzteren auch die Oxalsäure in mehr oder weniger bedeutender Menge an. Diese Erscheinung ist für alle von uns untersuchten zehn Pilzarten, mit alleiniger Ausnahme von *Penic. glaucum*[1]), festgestellt.

Die relativen Mengen von Citronen- und Oxalsäure, in denen sie in den Kulturen vorkommen, sind in den meisten Fällen umgekehrt proportional: mit Abnahme der Menge der ersteren nimmt die der zweiten zu und umgekehrt. Diese Korrelation offenbart die Umwandlung der Citronensäure in Oxalsäure, durch welche die erstere gleichsam ersetzt wird, — die Umwandlung, welche *Wehmer* annahm, der zuerst die Entstehung der Oxalsäure in den älteren Kulturen von *Citromyces* beobachtete.

[1]) In den Kulturen von diesem Pilze wurde nur eine geringe Menge der Citronensäure, bei völligem Fehlen der Oxalsäure, nachgewiesen.

Über den Verbrauch und die Bildung der Citronensäure in den Kulturen von Citromyces glaber auf Zucker.

Von

Wl. Butkewitsch.

(Aus der Landwirtschaftlichen Akademie Moskau, Petrowsko-Rasumowsko.)

(Eingegangen am 19. April 1922.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Daß die Pilze die Citronensäure als Kohlenstoffquelle gut ausnützen können, wurde schon von *Nägeli* festgestellt und darauf des öfteren von anderen Autoren bestätigt. Bekanntlich entwickeln sich die *Citromyces*-Arten auf dieser Säure besonders gut, woraus sich ergibt, daß sie dieselbe in den Fällen, wo sie die einzige Kohlenstoffquelle bildet, leicht assimilieren.

Als Illustration des Verbrauches der Citronensäure durch *Citromyces*-Arten beim Fehlen anderer Kohlenstoffquellen können die weiter unten folgenden Angaben dienen, welche bei einem unserer Versuche mit den Kulturen von *Citromyces glaber*, *C. citricus* und *Asperg. niger* auf 10 proz. Citronensäurelösung mit geringer Menge Ammoniak (0,05%) als Stickstoffquelle erhalten sind.

Tabelle C.

In jeder Kultur je 50 ccm Nährlösung. Temperatur 23—25°. Kulturdauer beinahe 3 Wochen.

Kulturen	Pilzdeckegewicht g	Acidität auf 10 ccm Kulturflüssigkeit in ccm $^1/_{10}$ N-NaOH	Ca-Citrat*) $[Ca_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot 2H_2O]$ g	Citronensäure $(C_6H_8O_7 \cdot H_2O)$ nach Ca-Citrat g
Citrom. glaber. . .	0,8490	0,3	0	0
Citrom. citricus . .	0,4865	0,3	0	0
Asperg. niger . . .	0.6119	219,5	1,956	1.535
Kontrollbestimmung (ohne Kultur) . .	—	150,9	6,345	4,981

*) Bei 110—120° getrocknet.

Bezüglich der Feststellung der Rolle, welche die Citronensäure in der Stoffumwandlung bei ihrer Bildung in den Kulturen auf Zucker spielt,

besitzt die Frage nach ihrem Verbrauch durch den Pilz in Anwesenheit des Zuckers ein größeres Interesse. Um diese Frage zu ergründen, haben wir die hier beschriebenen Versuche mit den Kulturen auf Zucker und Citronensäure unternommen[1]).

Versuch G—C. Kulturen auf Glucose und Citronensäure mit Ammoniumnitrat.

In diesem Versuche wurden die Kulturen von *Citromyces glaber* angesetzt. Als Kohlenstoffquelle dienten Glucose und Citronensäure, entweder zusammen oder jede Substanz für sich. In den einen Kulturen wurde die freie Citronensäure verwendet, in den anderen wurde sie mit Natriumcarbonat neutralisiert.

Insgesamt wurden sechs Nährlösungen für die Kulturen gebraucht. Alle Lösungen enthielten 0,5% Ammoniumnitrat (0,175% N) als Stickstoffquelle und außerdem das gewöhnliche Salzgemisch in der Menge 0,2% ($ZnSO_4$ — 0,02%).

G = Glucose 6%

GC = Glucose 6%, Citronensäure 2%

G(*C*) = Glucose 6%, Citronensäure 2%, Na_2CO_3 1,6%

C = Citronensäure 2%

C' = Citronensäure 7%

(*C*) = Citronensäure 2%, Na_2CO_3 1,6%

Mit jeder Nährlösung wurden je drei Kulturen angesetzt, die aufeinanderfolgend nach bestimmten Zeiträumen zur Analyse gebracht wurden. Jede Kultur enthielt je 50 ccm Nährlösung. Die Temperatur schwankte im Laufe des Versuches zwischen 22—24°.

Nach der Impfung bildete sich die Pilzdecke zuallererst in den Kulturen *G*, auf Glucose allein, darauf in den *GC* und *G*(*C*) und bedeutend später in den mit Citronensäure allein, besonders da, wo sie nicht neutralisiert wurde. In den Kulturen *C* erschien die Pilzdecke am dritten und in den *C'* erst am vierten Tage.

In den Kulturen G hörte das weitere Wachstum der Pilzdecke, die sich am ersten Tage schnell entwickelte, bald auf, und von dem vierten Tage an bis zum Schlusse des Versuches wies sie fast keine Veränderungen in ihren Aussehen auf. Nach vier Tagen, als die erste Serie der Kulturen zur Analyse gebracht wurde, waren die Pilzdecken in den Kulturen *GC* und *G*(*C*) schon bedeutend stärker als in G entwickelt. Die Kultur *G*(*C*) hatte die am stärksten entwickelte, faltige, reichlich mit Conidien bedeckte Pilzdecke. In den Kulturen *G* und *GC* waren die Decken conidienfrei und am Rande etwas nach unten gebogen — eine Erscheinung, die sich gewöhnlich bei Entwicklung der Pilze im zu sauren Milieu zeigt.

---

[1]) Die in dieser Mitteilung beschriebenen Versuche wurden im Laufe der Jahre 1918 und 1919 angestellt.

Im gegebenen Falle erschien die überschüssige Acidität offenbar als Resultat des Freiwerdens der Salpetersäure aus Ammoniumnitrat infolge der einseitigen Ausnutzung der Base dieses Salzes. Diese Erscheinung bei der Ausnutzung des Ammoniumnitrats als Stickstoffquelle durch die Pilze wurde zuerst von mir für *Asperg. niger* festgestellt[1]) und später auch bei *Citromyces* von *Buchner* und *Wüstenfeld*[2]) und von *Wehmer*[3]) nachgewiesen.

In den Kulturen auf Glucose allein erhielt sich die in ihnen durch die Anhäufung der freien Salpetersäure entstandene Anomalie bis zum Schlusse des Versuches, was man aus der konstant bleibenden Acidität der Flüssigkeit in allen drei aufeinanderfolgend genommenen Kulturen sehen kann[4]).

In den Kulturen GC, auf Glucose und Citronensäure, zeigte sich der Einfluß dieser Anomalie nur kurze Zeit; darauf verschwand sie, und der Pilz kam wieder zur normalen Entwicklung, schon nach sieben Tagen übertraf das Mycel dieser Kultur an Gewicht das der Kultur G(C) und war wie auch das letztere reichlich mit Conidien bedeckt. Die Anwesenheit der Citronensäure in den Kulturen schafft also die Bedingungen, die den Verbrauch der Salpetersäure durch den Pilz begünstigen[5]).

Die erste Serie (I) nach 4 Tagen der zur Analyse gebrachten Kulturen bildeten nur die Kulturen mit Glucose, *G*, *GC* und *G*(*C*), da die

[1]) *Wl. Butkewitsch*, Jahrb. f. wiss. Botan. **38**, 147. 1902.

[2]) *Ed. Buchner* und *Wüstenfeld*, diese Zeitschr. **17**, 395. 1909.

[3]) *C. Wehmer*, Chemiker-Zeit. 1913, S. 37.

[4]) Die hier in den Kulturen von *Citrom. glaber* auf NH_4NO_3 nachgewiesene Verzögerung in der Entwicklung des Mycels und der Conidien erscheint nur temporär. Die anfangs frei werdende Salpetersäure wird dem Anschein nach allmählich verbraucht, und ihr Einfluß verschwindet in den länger dauernden Kulturen. So geriet in einer Kultur von *Citrom. glaber* auf 10proz. Rohrzuckerlösung mit 0,5% NH_4NO_3 und 0,2% Salz ($ZnSO_4$ 0,02%) bei der Temperatur von 22° die angefangene Mycelentwicklung nach einigen Tagen ins Stocken; nach 2—3 Wochen erholte sich aber die Pilzdecke und auf ihr erschienen die Conidien. Auf derselben Nährlösung und bei denselben Bedingungen wurde die Hemmung der Pilzdeckenentwicklung bei *Penic. 2* (vgl. meine vorige Mitteilung in dieser Zeitschr. **131**, 333) gar nicht nachgewiesen. Bei geringem Gehalt von NH_4NO_3 in der Nährlösung kommen diese Hemmungserscheinungen auch in den Kulturen von *Citrom. glaber* nicht vor. In der einen dieser Kulturen auf 50 ccm Nährlösung mit 6% Glucose, 0,1% NH_4NO_3 und 0,15% Salzen ($ZnSO_4$ 0,02%) bei 25° wurde der Zucker nach 12 Tagen schon ganz verbraucht) und es bildete sich eine gute, faltige, mit Conidien bedeckte Pilzdecke, die in trockenem Zustande 0,802 g wog. — Dieselben Erscheinungen in Zusammenhange mit dem Gehalt von NH_4NO_3 in der Nährlösung beobachtete *Ritter* auch für *Asperg. niger* (*G. Ritter*, Die Materiale zur Physiologie der Schimmelpilze, 1916, S. 26, Russisch).

[5]) Hier entsteht unwillkürlich die Frage, ob die in unserem Versuch nachgewiesene Einwirkung der Citronensäure nicht im Zusammenhange steht mit denjenigen Besonderheiten derselben, infolge deren sie eine besonders geeignete Kohlenstoffquelle für die denitrifizierenden Mikroorganismen darstellt (*Giltay*sche Nährlösung).

übrigen noch nicht hinreichend entwickelte Milzdecken zu dieser Zeit hatten.

In der zweiten Serie (II), nach 7 Tagen, wurden fünf Kulturen untersucht. Zu dieser Zeit waren die Pilzdecken aller Kulturen, mit alleiniger Ausnahme von *G*, mit Conidien bedeckt.

In der dritten Serie (III), nach 11 Tagen, wurden alle sechs Kulturen und in der vierten (IV), nach 20 Tagen, die übrigen C, C′ und (C) (die in der ersten Serie nicht der Analyse unterworfen wurden) verarbeitet.

Die Flüssigkeit der zur Analyse gebrachten Kulturen wurde nach dem Erhitzen derselben im *Koch*schen Sterilisator und Abkühlen durch ein gewogenes Filter abfiltriert. Die Pilzdecke wurde auf das Filter übertragen, mit Wasser ausgewaschen und mit dem Filter zusammen getrocknet und gewogen. — Das Filtrat wurde mit Waschwasser zusammen bis zum bestimmten Volumen (150 ccm) gebracht, und aus ihm wurden einzelne Portionen zur Bestimmung der Acidität, der Citronen- und Oxalsäure und des Zuckers (in den Kulturen mit Glucose) genommen.

Die Acidität der Flüssigkeit wurde durch Titrieren derselben (10 ccm) mit $^1/_{10}$ N.-Natronlauge gegen Phenolphtalein als Indicator bestimmt.

Die Citronen- und Oxalsäure wurden aus der zu ihrer Bestimmung genommenen Flüssigkeit (100 ccm) durch Fällung mit Calciumacetat zusammen ausgeschieden, nachdem sie durch Verdunsten auf dem Wasserbade bis zu geringem Volumen eingeengt und bis zu schwach saurer Reaktion mit Ammoniak neutralisiert war. Der dabei sich bildende Niederschlag wurde nach dem Erhitzen abfiltriert, getrocknet und gewogen. Darauf wurde der gewogene Niederschlag in Salzsäure von neuem aufgelöst und aus der auf diese Weise erhaltenen Lösung die Oxalsäure durch Zusatz von Natriumacetat ausgeschieden. Nach der Bestimmung der Oxalsäure wurde die Citronensäure aus der Differenz gefunden. — Über die Anwesenheit der Oxalsäure in der analysierten Flüssigkeit konnte man schon nach der Art der Bildung des Niederschlages beim Calciumacetatzusatze urteilen. Der Niederschlag des Calciumoxalats bildet sich auf einmal sogleich nach dem Calciumacetatzusatz, während das Calciumcitrat sich nur allmählich beim Erhitzen ausscheidet.

Die Zuckerbestimmung wurde in den Kulturen mit Glucose nach dem Verfahren von *Bertrand*[1]) ausgeführt.

Die in der Tabelle *G*—*C* zusammengestellten Ergebnisse der Analyse für die von Calciumacetat erhaltenen Niederschläge und für Zucker sind auf die gesamte Kulturflüssigkeit und für Acidität auf 10 ccm vom ursprünglichen Volumen derselben (50 ccm) bezogen.

---

[1]) *Bertrand*, Bull. de la soc. chim. **35**, 1285. 1906. Vgl. auch *Abderhaldens* Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden Bd. II, S. 181. 1910.

Die Zahlen, die das Gewicht der vom Calciumacetat erhaltenen geringen Niederschläge für die Kulturen *G* angeben, sind eingeklammert. Diese Niederschläge, die als Flocken sich ausscheiden, scheinen weder Zitronen- noch Oxalsäure zu enthalten. Ebenfalls zu unsicher, um über den Citronensäuregehalt ein Urteil zu fällen, sind die geringen Niederschläge, die weniger als 0,1 g wogen, auch in den anderen Kulturen; daher sind die auf diese Niederschläge sich beziehenden Zahlen in der Tabelle auch in Klammern gestellt.

Tabelle G—C.

Kulturen und Serien (I = 4 Tage, II = 7 Tage, III = 11 Tage, IV = 20 Tage)		Pilzdeckegewicht g	Acidität*) auf 10 ccm Kulturflüss. in ccm 1/10 N-NaOH (mit Phenolpht.)	Durch Ca-Acetat ausgeschiedene Niederschläge**) g	Calciumoxalat***) g	Oxalsäure ($C_2O_4H_2$) g	Citronensäure ($C_6H_8O_7$) g	Glucose g
G	I	0,3095	7,2	(0,0830)	—	—	—	1.5660
	II	0,3760	7,5	(0,0700)	—	—	—	1.2263
	III	0,4370	7,5	(0,0680)	—	—		1,0620
GC	I	0,5190	33,6	1,0870	—	—	0,7826	1.0766
	II	1,1685	10,8	0,3345	—	—	0,2408	0,0378
	III	1,0935	1,5	(0,0555)	—	—	(0,0400)	0
G(C)	I	0,7680	6,6	1,1110	0,2570	0,1584	0,6149	0,4125
	II	0,9620	2,1	0,8710	0,7035	0,4336	0,1206	—
	III	0,8220	1,2	1,0170	0,9400	0,5794	(0,0554)	—
C	II	0,1370	9,0	0,1800	—	—	0,1296	—
	III	0,1570	3,3	(0,0570)	—	—	(0,0410)	—
	IV	0,0955	2,4	(0,0750)	—	—	(0,0540)	—
C'	II	0,0505	86,1	3,4080	—	—	2,4538	—
	III	0,2870	43,5	1,5610	—	—	1,1239	—
	IV	0,4260	3,6	(0,0615)	—	—	(0,0443)	—
(C)	III	0,0260	0,6	0,7875	0,1270	0,0783	0,4756	—
	IV	0,0225	0,6	0,8960	0,1570	0,0968	0,5321	—
Kontrollbestand (in Nährlösungen ohne Kultur)	*GC*	—	33,9	1,1900	—	—	0,8870	2,9720
	C	—	33,6	1,2740	—	—		—

*) Auf Lackmus blieb die Reaktion der Flüssigkeit in den Kulturen *G* bis zum Schlusse des Versuches (in allen drei Serien) stark sauer. Bei den Kulturen *GC* war sie nur in den zwei ersten Serien sauer und in der III. schon neutral. Die Kultur *G(C)* hatte eine schwach saure Reaktion in der I. Serie und eine neutrale in der II. und III.

**) Die Niederschläge wurden bei 110—120° getrocknet. Dabei verliert Calciumcitrat $[Ca_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot 4\,H_2O]$ zwei Moleküle Krystallwasser.

***) Durch Titriren der Oxalatniederschläge mit Permanganat sind folgende Werte für den Gehalt der Oxalsäure in demselben gefunden:

$$G(C)\begin{cases} I = 62{,}1\% \\ II = 61{,}8\% \\ III = 61{,}3\% \end{cases} \qquad (C)\begin{cases} III = 61{,}9\% \\ IV = 62{,}4\% \end{cases}$$

Nach der Berechnung enthält Calciumoxalat 61,64% Oxalsäure.

Aus den in der Tabelle angeführten Angaben für die Kulturen *GC* und *G(C)* sieht man, daß die denselben zugesetzte Citronensäure auch in Anwesenheit von Zucker durch den Pilz verbraucht wird, wobei dieser

Verbrauch sich nicht nur über die freie, sondern auch über die durch die Base gebundene Säure erstreckt. Den Verbrauch der Citronensäure im letzteren Falle begleitet der Ersatz derselben durch die Oxalsäure.

Die bei der Analyse der Kulturen *GC* und *G*(*C*) erhaltenen Resultate sind auf den Abb. 1 und 2 graphisch dargestellt. Aus dieser Darstellung

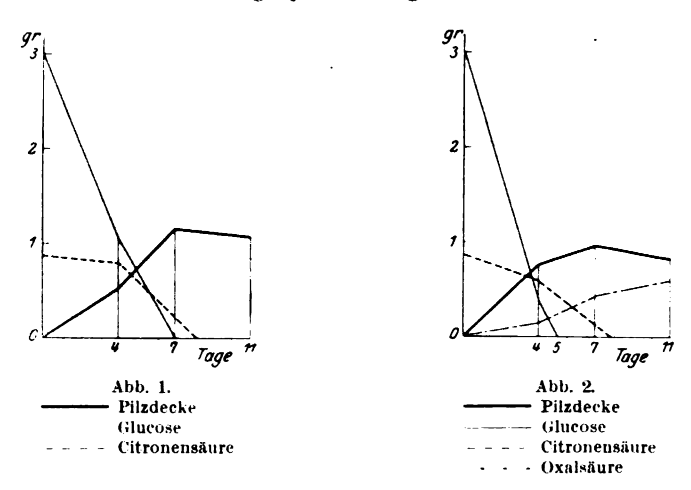


Abb. 1.
——— Pilzdecke
Glucose
- - - - Citronensäure

Abb. 2.
——— Pilzdecke
-·-·-·- Glucose
- - - - Citronensäure
· · · Oxalsäure

kann man leicht sehen, daß der Verbrauch der Citronensäure im Zusammenhange mit dem Gehalte der Glucose in der Nährlösung steht. Mit der Abnahme der letzteren nimmt der erstere zu.

Der Ersatz der verbrauchten Citronensäure durch die Oxalsäure muß eine Verminderung des Gewichtes des durch Calciumacetat sich bildenden Niederschlages im substituierten Teil im Verhältnis etwa 5: 4 zur Folge haben. Ein etwas größeres Sinken des Niederschlaggewichts in der Kultur *G*(*C*) — II konnte durch teilweisen Ersatz der Citronensäure durch die aus Ammoniumnitrat freiwerdende Salpetersäure bedingt werden. Daß diese Erscheinung hier wirklich stattfand, kann man aus dem bedeutenden Steigen der Acidität in der Kultur *G*(*C*) — I annehmen. Eine gewisse nachfolgende Zunahme des Gewichtes des mittels Calciumacetats ausgeschiedenen Niederschlages kann ihre Erklärung entweder in dem Verbrauch der sich in der Kultur befindenden Salpetersäure oder in dem Steigen der Menge der die Oxalsäure bindenden Basen infolge der Ammoniakbildung bei der regressiven Metamorphose der Mycelstoffe, nach der Erschöpfung des in der Kultur vorkommenden Zuckers, finden.

Die Bedeutung der Citronensäure als Kohlenstoffquelle kann durch die Angaben für die Kulturen *C* und *C'* geschätzt werden. Der die Produktivität der Citronensäureausnutzung durch den Pilz charakterisierende „ökonomische Koeffizient", welcher durch den Pilzdecken-

zuwachs auf 100 g verbrauchter Säure ausgedrückt wird, hat für diese Kulturen folgende Werte[1]).

Kulturen	C_{II}	C_{III}	C'_{II}	C'_{III}	C'_{IV}
Mycelzuwachs auf 100 g verbrauchter Citronensäure[2]) ($C_6H_8O_7$)	18,1	18,6	8,3	14,8	14,1

Aus den angeführten Zahlen sieht man, daß der ökonomische Koeffizient der Ausnutzung der Citronensäure mit dem Steigen ihres Gehaltes in der Nährlösung sinkt. Auf den Lösungen mit höherer Konzentration verbraucht der Pilz die Citronensäure forciert und unproduktiv. Besonders niedrig ist der Koeffizient auf 7 proz. Citronensäurelösung im Anfange der Entwicklung des Pilzes (C'_{II}); darauf verdoppelt er sich und hält sich weiterhin auf der gleichen Höhe. Auf 2proz. Lösung (C_{II}, C_{III}) erreicht der Koeffizient schon eine bedeutende Größe, beinahe 20, die in den Zeitgrenzen der in der Tabelle aufgeführten Kulturen[3]) (7—11 Tage) fast konstant bleibt.

Zum Vergleich mit den oben angeführten Koeffizienten für Citronensäure geben wir weiter unten die für Glucose und für Glucose und Citronensäure bei gleichzeitiger Ausnutzung derselben durch den Pilz auf Grund der Ergebnisse an, welche die Kulturen *G*, *GC* und *G*(*C*) betreffen. Für die zwei letzteren ist das Verhältnis des Pilzdeckenzuwachses zur Gesamtmenge (als 100 angenommen) der durch den Pilz verbrauchten Glucose und Citronensäure genommen[4]).

		G_I	G_{II}	G_{III}	—
Mycelzuwachs auf 100 g verbrauchter	Glucose	22,0	21,5	22,9	—
		GC_I	GC_{II}	$G(C)_I$	$G(C)_{II}$
	Glucose + Citronensäure	26,0	32,6	27,2	25,8

Der ökonomische Koeffizient für die Glucose übertrifft also nur unbedeutend den für die Citronensäure bei 2 proz. Gehalt derselben in der

[1]) Bei der Berechnung der verbrauchten Citronensäure benutzten wir die Angaben, die bei der Analyse (Bestimmung nach Ca-Salz) erhalten waren. Für die Kultur *C''*, in welcher die ursprüngliche Menge der Citronensäure durch ihre Ausscheidung als Calciumsalz nicht bestimmt war, ist eine Korrektur in die Quantität der verwendeten Säure im Maßstabe des gewöhnlichen Verlustes bei der Analyse infolge der Löslichkeit des Calciumcitrats eingeführt, um für sie den Wert zu erhalten, der den anderen durch die Analyse gewonnenen entspricht, und für den ursprünglichen Gehalt der Citronensäure ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) in der Kultur ist der Wert 3,350 g genommen.

[2]) Die Citronensäure ist hier als wasserfrei angenommen.

[3]) Zur Berechnung der ökonomischen Koeffizienten sind nur die Kulturen genommen, in denen die Mycelentwicklung noch nicht aufgehört hatte.

[4]) Für Koeffizientberechnung sind nur die Kulturen mit noch nicht abgeschlossener Mycelentwicklung benutzt. Eine gewisse Ausnahme bildet nur die Kultur G(C)II, die wahrscheinlich auch die Periode nach dem Aufhören des Pilzzuwachses teilweise umfaßt.

Nährlösung. Die Bedingungen der Pilzentwicklung in den Kulturen *G* waren zwar infolge der Anhäufung von freier Salpetersäure in denselben nicht ganz normal, der beständig bleibende Wert des Koeffizienten für alle drei aufeinanderfolgend genommenen Kulturen weist aber darauf hin, daß dieser Umstand auf denselben nicht besonders bedeutend einwirkte, indem er sowohl den Mycelzuwachs als auch den Glucoseverbrauch in gleichem Maße beschränkte.

Was die Kulturen auf Glucose und Citronensäure anlangt, so wird der ökonomische Koeffizient für sie durch bedeutend größere Werte als für die Kulturen auf Glucose und auf Citronensäure allein ausgedrückt. Besäße der Verbrauch von Glucose und Citronensäure in der Kultur GC_{II} dieselbe Produktivität wie auch in den Kulturen *G* und *C*, so müßte sie eine Pilzdecke mit dem Gewichte von 0,7674 g erzeugen, während sie in der Tat 1,1685 g wog.

Die Kombination von Glucose mit der Citronensäure bewirkt also eine bedeutende Steigerung der Produktivität des Stoffwechsels, was vielleicht eine der vorteilhaften Seiten der Bildung von Citronensäure bei der Entwicklung des Pilzes auf Zucker darstellt.

Versuch S—C. Kulturen auf Rohrzucker und Citronensäure mit ameisensaurem Ammonium.

Für diese Kulturen wurden zwei Pilze, *Citrom. glaber* und *Penic.* 2[1]), verwendet.

Da im vorigen Versuche mit den Kulturen von *Citrom. glaber* auf Glucose mit Ammoniumnitrat eine hemmende Wirkung der aus diesem Salz freiwerdenden Salpetersäure auf die Mycelentwicklung nachgewiesen werden konnte, so wurde in diesem Versuch ameisensaures Ammonium als Stickstoffquelle gebraucht, wobei wir von der Annahme ausgingen, daß die Ameisensäure infolge ihrer Zersetzung durch den Pilz[2]) nicht angehäuft werden wird. Diese Erwartungen gingen aber nicht ganz in Erfüllung, und das ameisensaure Ammonium zeigte auch einen hemmenden Einfluß auf die Mycelentwicklung, die in den ersten Tagen ziemlich langsam ging.

In den Kulturen, in denen der Nährlösung freie Citronensäure zugesetzt wurde, entwickelte sich das Mycel, wenigstens während längerer Zeit, gar nicht. Nur nach Ablauf von 2—3 Wochen konnte man das Erscheinen der Pilzdecke in einigen dieser Kulturen beobachten. Hier betätigte die Citronensäure einen Einfluß, welcher dem bei den Kulturen

---

[1]) Diesen Pilz isolierte ich von verschimmelter Wurst. Vgl. meine vorige Mitteilung in dieser Zeitschr. **131**, 332. 1922.

[2]) Über die Zersetzung der Essig- und Ameisensäure durch die Pilze vgl. die Angaben von *Laborde* für *Allescheria* und von *Duclaux* für *Asper. niger* und *Pen. glaucum*. — *Wehmer*, Chemische Wirkungen der Aspergillaceen. Lafars Technische Mycologie Bd. IV, S. 258.

mit Ammoniumnitrat festgestellten gerade entgegengesetzt war. Daher müßten die Kulturen mit freier Citronensäure aus dem Versuche ausgeschlossen wreden; es ist also nicht gelungen, den Verbrauch der Säure durch den Pilz in diesen Kulturen zu verfolgen. Nur die Kulturen, welche die Citronensäure als Natriumsalz enthielten, wurden untersucht.

Die Nährlösungen der Kulturen, die zu diesem Versuch benutzt wurden, hatten folgende Zusammensetzung.

Alle Lösungen enthielten je 1% ameisensaures Ammonium (0,22% N) und je 0,2% gewöhnliches Salzgemisch ($ZnSO_4$ — 0,02%) und überdies:

$$S = \text{Rohrzucker } 10\%. \quad S(C)\begin{cases}\text{Rohrzucker } 10\% \\ \text{Citronensäure } 2\% \\ Na_2CO_3 \ 1{,}6\%\end{cases}$$

Außerdem wurden noch die parallelen Kulturen auf der Nährlösung *S* ohne Zinksulfat aufgestellt. Eine solche Zusammenstellung der Kulturen mit und ohne $ZnSO_4$ wurde in Anbetracht des bei *Citromyces* stark ausgeprägten Einflusses dieses Salzes auf ihre Entwicklung eingeführt.

Dieser Einfluß kann durch die folgenden Ergebnisse illustriert werden, die bei den parallelen Kulturen mit $ZnSO_4$ (0,02%) und ohne dasselbe für *Citrom. glaber* und *C. citricus* erhalten wurden. Die Nährlösung enthielt Glucose 6%, NH_4NO_3 — 0,1% und Salze 0,15%. Die Kultur wurde 12 Tage bei einer Temperatur von 22—25° gezüchtet.

	C. glaber		*C. citricus*	
	+ *Zn*	— *Zn*	+ *Zn*	— *Zn*
Pilzdeckegewicht =	0,802 g	0.402 g	0.855 g	0.469 g
Zucker in Kulturflüssigkeit	0	+	0	+

Was den Einfluß des Zinksulfats auf den Stoffwechsel anlangt, so gibt *Mazé*[1]) an, daß die Abwesenheit dieses Salzes die Anhäufung der Citronensäure in den Kulturen auf Zucker begünstigt.

Für jeden der in diesem Versuch geprüften Pilze (*C. glaber* und *Pen. 2*) wurden je drei Kulturen auf jeder Nährlösung angesetzt, und für jede Kultur wurden je 50 ccm von diesen Lösungen untersucht. Die Temperatur schwankte während des Versuches zwischen 18—22°. Die Dauer der Kulturen war bei *Citromyces glaber* und *Pen. 2*, wie schon erwähnt ist, ungleich, und zwar

	I	II	III
Citrom. glaber	14	18	28 Tage
Penic. 2	6	9	18 „

Die Analyse der Kulturen wurde bei diesem Versuche ebenso wie bei dem vorigen G—C ausgeführt. Jedoch wurde der Zucker nicht quanti-

[1]) *P. Mazé*, Ann. de l'inst. Pasteur **23**, 830. 1909.

tativ bestimmt, sondern nur durch Prüfung mit *Fehling*scher Lösung seine An- oder Abwesenheit in der Kulturflüssigkeit festgestellt.

Die Ergebnisse der Analyse sind in der Tabelle S—C zusammengestellt.

Tabelle S—C.

			Pilzdeckegewicht g	Reaktion der Kulturflüssigkeit auf Lackmus	Acidität auf 10 ccm Kulturflüss. in ccm $^1/_{10}$ n-NaOH (mit Phenolpht.)	a) Durch Ca-Acetat ausgeschied. Niederschläge g	Ca-Oxalat **) im Niederschlag a) g	Zucker
Citrom. glaber. (I = 14 Tage, II = 18 Tage, III = 28 Tage)	*S*	I	1,2935	schw. sauer	1,1	0,0140	—	wenig
		II	1,3255	neutral	0,6	0,0510	+	0
		III	1,0320	„	0,8	0,1940	0,1580	0
	S(= *Zn*)	I	0,2480	sauer	3,5	0,0390	—	viel
		II	0,3540	„	4,5	0,0650	—	„
		III	0,5900	„	6,2	0,0530	—	nicht viel
	S(*C*)	I	1,3580	„	4,8	1,1670	0,2090	„ „
		II	1,4950	schw. sauer	2,1	0,9790	0,5565	0
		III	1,2905	neutral	0,8	1,0540	0,8985	0
Penic. 2 (I = 6 Tage, II = 9 Tage, III = 18 Tage)	*S*	I	1,3305	schw. sauer	1,5	0,0180	—	Spuren
		II	1,1665	neutral	1,5	0,0465	+	0
		III	0,8200	schw. alkal.	0,6	0,0770	+	0
	S(= *Zn*)	I	0,2910	sauer	5,7	0,0615	—	viel
		II	0,4815	„	5,6	0,0660	—	„
		III	0,7235	„	5,3	0,0570	—	nicht viel
	S(*C*)	I	1,2605	schw. sauer	3,0	0,9825	0,0365	Spuren
		II	1,1305	alkal.	alkal.	0,7750	0,1805	0
		III	1,0400	stark alkal.	„	0,5490	0,1175	0
Kontrollbestand in Nährlösung (ohne Kultur)	*S*(*C*)		—	—	—	1,2855	—	—
	C *)		—	—	—	1,3620	—	—

*) Nährlösung ohne Zucker.

**) Durch Titrieren der Oxalatniederschläge mit Permanganat sind folgende Werte für den Gehalt der Oxalsäure in denselben gefunden:

C. glaber S(*C*) { I = 61,5%, II = 62,3%, III = 61,8% } *Pen. 3 S*(*C*) { I = 62,7%, II = 61,5%, III = 62,1% } $C_2O_4Ca \cdot H_2O$ enthält 61,64% $C_2O_4H_2$

Auf den in der Tabelle angeführten Angaben tritt zuerst die Einwirkung des Zinksulfats hervor, welche sich in starker Verzögerung der Mycelentwicklung bei der Beseitigung dieses Salzes aus der Nährlösung äußerte. Damit läßt sich, gemäß den Angaben von *Mazé*, auch ein Ansteigen des Citronensäuregehaltes in den Kulturen ohne Zink nachweisen, was in dem Gewichte der durch Calciumacetat ausgeschiedenen Niederschläge, sowie auch in der Acidität der Kulturflüssigkeit zum Ausdruck kam.

Die Zunahme des Gewichtes der Niederschläge in den Kulturen mit Zink der zweiten und besonders der dritten Serie (nachdem der Zucker in denselben schon ganz verbraucht war) wurde nicht durch das Steigen

des Gehaltes der Citronensäure, sondern durch die Ansammlung der Oxalsäure als Ammoniumoxalat bedingt, welches sich bei der regressiven Metamorphose der stickstoffhaltigen Stoffe des Mycels bildete. Daß dieselbe hier stattfand, sieht man aus der Verminderung des Mycelgewichtes. Die Hauptmasse der durch Calciumacetat ausgeschiedenen Niederschläge bestand in den Kulturen S der zweiten und dritten Serie aus Calciumacetat. Das konnte man nach der Art der Bildung der Niederschläge sowie auch nach ihrem mikroskopischen Aussehen (Oktaeder) leicht konstatieren, und für den Niederschlag aus der Kultur S_{III} von *Citromyces glaber* wurde das durch die quantitative Bestimmung der Oxalsäure in demselben festgestellt.

In den Kulturen $S(C)$ mit Natriumcitrat wurde die Mycelentwicklung ebenso wie auch bei dem vorigen Versuch in den Kulturen $G(C)$, von dem Verbrauch der Citronensäure neben dem Zucker begleitet. In den Kulturen von *Citromyces glaber* wurde die aus Natriumcitrat verbrauchte Säure durch die Oxalsäure in beinahe äquivalenter Menge ersetzt[1]). Ein solcher Ersatz fand auch in den Kulturen von *Pen. 2*, aber nur teilweise statt; teils befand sich die Base, die bei dem Verbrauch der Citronensäure aus ihrem Natriumsalz frei wurde, als Carbonat in der Kultur. Die Anreicherung desselben bedingte das Erscheinen der alkalischen Reaktion in der Kultur der zweiten und besonders der dritten Serie. Indem man die Ergebnisse der Analyse dieser Kulturen zusammenstellt, kann man nicht nur den Verbrauch der Citronensäure, sondern auch der aus ihr vorher gebildeten Oxalsäure nachweisen. Diese Säure stellt also gleichsam eine Zwischenstufe bei der oxydativen Umwandlung der Citronensäure bis zum Kohlendioxyd dar. Vielleicht macht diese Umwandlung überhaupt eine solche Zwischenstufe durch.

Abb. 8. Kulturen $S(C)$ von *Citrom. glaber* und *Pen. 2*.
P. 2. ——— / C. gl. — — — Citronensäure, P. 2 - - - - - - / C. gl. - - - - Oxalsäure.

Die soeben genannten Verhältnisse lassen sich auf der Zusammenstellung leicht verfolgen, die nachfolgend in der Tabelle $S(C)$ angegeben ist.

[1]) Eine gewisse Zunahme des Niederschlagsgewichtes in der Kultur III ist offenbar durch die Bildung des Ammoniumoxalats in derselben bei der regressiven Metamorphose der Mycelstoffe bedingt. Vgl. den vorigen Versuch G—C.

Tabelle S(C).

Kulturen S(C)	In der ursprünglich. Nährlösung	*Citrom. glaber* I (14 Tg.)	II (18 Tg.)	III (28 Tg.)	*Penic. 2* I (6 Tg.)	II (9 Tg.)	III (18 Tg.)
Citronensäure ($C_6H_8O_7$) g	0,9533	0,6898	0,2977	0,1119	0,6811	0,4280	0,3107
Oxalsäure ($C_2O_4H_2$) g	0	0,1288	0,3430	0,5538	0,0225	0,1113	0,0724

Die in der Tabelle $S(C)$ befindlichen Angaben sind in der Abb. 3 graphisch dargestellt.

Kulturen mit Calciumcarbonat.

Außer den oben beschriebenen wurden noch drei Kulturen von *Citromyces glaber* auf derselben Nährlösung S aufgestellt, die sich von den vorigen nur dadurch unterscheiden, daß ihnen Calciumcarbonat einige Tage nach der Impfung, nachdem sich hinreichend starke Pilzdecken gebildet hatten, zugesetzt wurde. Bald darauf konnte man eine Ablagerung von Calciumcitrat als eigentümliche Kruste auf der Oberfläche des Calciumcarbonats nachweisen. Quantitativ wurde die Citronensäure hier nicht bestimmt[1]), und für diese Kulturen können nur die Gewichte der Pilzdecken und der Gehalt der Oxalsäure angegeben werden.

	I (14 Tage)	II (18 Tage)	III (28 Tage)
Pilzdecke (ohne Ca-Oxalat)	0,5825 g	1,4285 g	1,1080 g
Oxalsäure	—	0,0773 g	0,2963 g
Zucker	viel	—	—

Da alle Kulturen, wie schon erwähnt ist, bedeutende Mengen der Citronensäure enthielten, so kann man daraus schließen, daß die Anhäufung derselben in den Kulturen von *Citromyces* mit Calciumcarbonat nicht nur bei relativem Mangel an Stickstoff und in der Periode, wenn seine Quelle ganz durch den Pilz erschöpft ist, stattfindet (wie das *Mazé*[2]) angibt), sondern auch bei normaler Entwicklung des Pilzes, bei einem Überschuß des ihm zugänglichen Stickstoffs. Daraus folgt, daß die Citronensäure ein Produkt des Stoffwechsels darstellt, welcher die normale Entwicklung des Mycels begleitet.

Dieses Resultat wurde später auch bei unseren Versuchen mit *Asperg. niger*, die wir in einer besonderen Mitteilung erörtern werden, bestätigt.

Vorläufig möchten wir hier nur darauf hinweisen, daß die Anhäufung der Citronensäure auch bei *Asperg. niger* nicht mit Stickstoffmangel

[1]) Die Niederschläge des Calciumcitrats wurden ausgeschieden, aber nicht gewogen, da sie verlorengegangen waren. Hier wurde die Analyse ebenso wie im Versuche A—B ausgeführt, der in meiner vorigen Mitteilung (diese Zeitschr. **131**, 333. 1922) beschrieben ist.

[2]) *P. Mazé* und *A. Perrier*, Ann. de l'inst. Pasteur **18**, 553. 1904.

verknüpft ist, worauf *Currie*[1]), übereinstimmend mit den früheren Angaben von *Mazé* für *Citromyces*, hinweist. Die Citronensäure häuft sich reichlich in den Kulturen von *Asperg. niger* an, auch wenn die Entwicklung des Pilzes bei einem Überschusse aller für dieselben notwendigen Stoffe stattfindet.

Zusammenfassung.

Die Citronensäure bildet sich nicht nur bei den anormalen Entwicklungsbedingungen des Pilzes, welche *Mazé* als die günstigsten für ihre Anhäufung angibt, sondern auch bei den normalen, beim Überschusse aller notwendigen Nährstoffe. Der Zusatz des Calciumcarbonats zu den Kulturen des Pilzes, der im Zustande solcher Entwicklung sich befindet, ruft eine reichliche Ablagerung des Calciumcitrats in demselben hervor.

Wenn die Citronensäure als freie Säure oder ihr Natriumsalz der Nährlösung, die Zucker enthielt, zugesetzt wird, so wird sie zusammen mit dem letzteren von dem Pilz nach Maßgabe seiner Entwicklung verbraucht. Wenn die an die Base gebundene Citronensäure verbraucht wird, beobachtet man das Auftreten von Oxalsäure.

Die angeführten Ergebnisse sprechen dafür, daß die Citronensäure ein übliches Produkt des Stoffwechsels bei normaler Entwicklung des Pilzes darstellt.

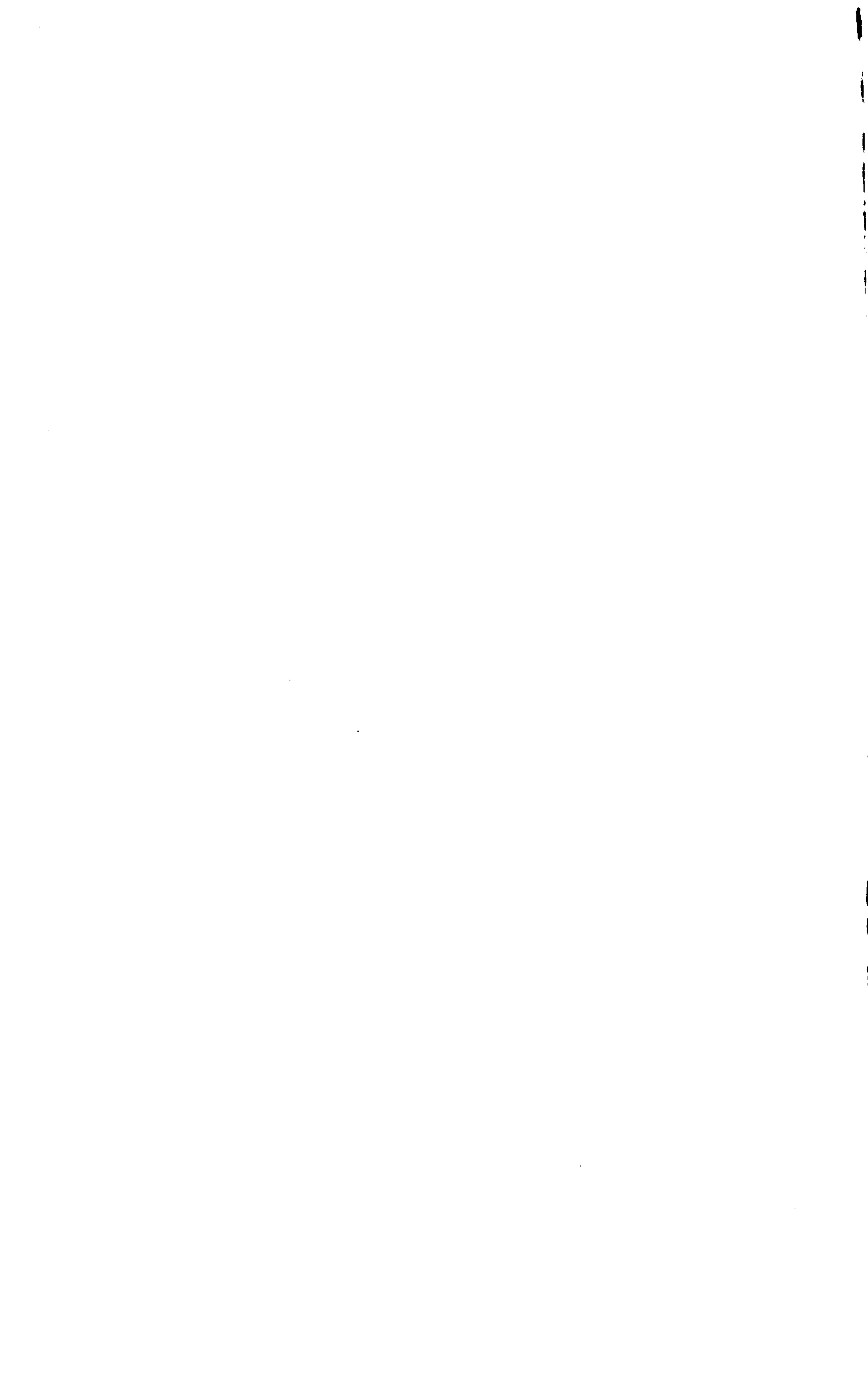
Der „ökonomische Koeffizient" nähert sich für die Citronensäure in schwachen Lösungen dem für Zucker. Mit Zunahme des Gehaltes an Citronensäure in der Lösung nimmt der ökonomische Koeffizient ihrer Ausnutzung ab. Auf Lösungen von hoher Konzentration verbraucht der Pilz die Citronensäure forciert und unproduktiv.

Wenn der Pilz den Zucker und die Citronensäure gleichzeitig ausnutzt, so steigt der ökonomische Koeffizient auf einen bedeutend größeren Wert an als für die Kulturen auf Zucker und auf Citronensäure allein. Durch Kombination von Zucker mit Citronensäure läßt sich also eine Steigerung der Produktivität des Stoffwechsels nachweisen.

Die Anwesenheit der Citronensäure in den Kulturen von *Citromyces glaber* mit Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle beseitigt die nachteilige Einwirkung der Salpetersäure, die in den Kulturen auf Zucker allein sehr deutlich zum Ausdruck kommt. Das Vorkommen dieser Säure scheint also den Verbrauch der Salpetersäure durch den Pilz zu begünstigen.

---

[1]) *J. Currie*, Journ. of biol. chem. **31**, 15; diese Arbeit über die Citronensäurebildung bei *Asper. niger* ist mir erst unlängst durch das Referat im Zentralbl. f. Biochem. u. Biophys. **20**, 300. 1919 bekannt geworden.



Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin,

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hunderteinunddreißigster Band

Fünftes und sechstes Heft

Ausgegeben am 16. September 1922



Berlin

Verlag von Julius Springer

1922

Die **Biochemische Zeitschrift**

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. **Der Preis des laufenden Bandes im Umfange von 40 Bogen beträgt M. 360.—.**

Der für diese Zeitschrift berechnete Bandpreis hat seine Gültigkeit nur während der Dauer des Erscheinens. Der Verlag muß sich bei der Unsicherheit der Entwicklung der wirtschaftlichen Verhältnisse vorbehalten, den zurzeit geltenden Preis nach Abschluß des Bandes zu erhöhen.

Die Biochemische Zeitschrift ist durch jede Buchhandlung sowie durch die unterzeichnete Verlagsbuchhandlung zu beziehen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens 2 Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Redakteur,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Die Verfasser erhalten 100 Sonderabdrücke ihrer Abhandlungen kostenfrei, bis zu einem Umfang von $1^1/_2$ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur 75, weitere gegen Berechnung. Für den 16 seitigen Druckbogen wird ein Honorar von M. 40.— gezahlt.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer
Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

---

131. Band. **Inhaltsverzeichnis.** Heft 5/6.

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe III. Umschlagseite!

Zur Oligodynamie des Silbers[1]).

IV. Mitteilung.

Von

R. Doerr und **W. Berger.**

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel.)

(Eingegangen am 20. April 1922.)

In einer früheren Mitteilung (diese Zeitschr. **107**, 207) wurde festgestellt, daß die bactericide Wirkung metallischen Silbers durch *Glühen*, mehrmaliges *Kochen* in destilliertem Wasser oder durch mehrtägiges Einbetten des Silbers in *Agargallerte* gänzlich *aufgehoben* werden kann. Da sich der chemische Träger der oligodynamischen Ag-Wirkung als *dialysabel* erwies und da er in feuchte Agargallerte ebenso gut zu diffundieren vermochte als Ag_2O oder $AgNO_3$, wurde sowohl die *Saxl*sche Hypothese einer *Fernwirkung* wie auch die Annahme einer *kolloiden Lösung* des reinen Silbers abgelehnt; die Versuchsergebnisse sprachen eindeutig dafür, daß an der Oberfläche der Metallstücke *Verbindungen* entstehen, deren Wasserlöslichkeit ihre cytotoxischen Effekte bedingt. Glühen verwandelt diese Verbindungen in metallisches, daher unwirksames Silber, was für Ag_2O leicht gezeigt werden konnte, Kochen oder Kontakt mit Wasser löst sie rasch oder langsam, wodurch die Ag-Stücke gleichfalls ihre „Oligodynamie" einbüßen.

Die tatsächlichen Angaben ließen sich bei erneuten Nachprüfungen in jeder Hinsicht bestätigen.

Namentlich trat die Fähigkeit des oligodynamischen Faktors, dünne tierische *Membranen (Fischblasen)* rasch zu *passieren*, in mehrfach variierten Versuchsanordnungen deutlich zutage, wobei es gleichgültig war, ob man den Dialysierschlauch mit Streifen wirksamen Silbermetalls und destilliertem Wasser oder mit einer bereits fertigen oligodynamischen Lösung (sogenanntem „aktivierten" Wasser) beschickte. Bettete man die Dialysierschläuche in mit Colibakterien beimpften Agar ein, ließ zunächst bei Zimmertemperatur 2—3 Stunden stehen und brachte dann die Agarplatten samt den eingeschlossenen Dialysierschläuchen in den Thermostaten, so waren nach 12—16stündiger Bebrütung im Agar regelmäßig *keimfreie Zonen* zu erkennen, welche die äußere Kontur der Membran umrahmten; bei der Füllung der Schläuche mit „aktiviertem" Wasser waren die

[1]) Die Arbeit wurde mit einer Spende der „Freiwilligen Akademischen Gesellschaft in Basel" ausgeführt.

Zonen *überall entwickelt und gleich breit*, bei der Beschickung mit Ag-Stücken waren sie *dort am breitesten, wo sich die Silberstücke der Kontur des Fischblasenstückes näherten*, und konnten an Stellen, die von den Ag-Stücken weit entfernt waren, auch ganz fehlen. Die wachstumsfreien Zonen folgten also, falls die oligodynamische Substanz erst zu einer Zeit in Lösung ging, wo bereits ein lebhafter osmotischer Prozeß im Gange war, den Umrissen des Silberblechs und nicht den Konturen der Dialysierschläuche, ein Verhalten, das wir übrigens neuerdings auch zu beobachten vermochten, wenn wir festes Ag_2O, das an Papierstreifen durch Celloidin fixiert und von letzterem bedeckt war, im Inneren von Fischblasen in stark verzögertem Tempo in Lösung gehen ließen. *Diese Erscheinung bildet somit nur einen Ausdruck für die Schwerlöslichkeit der bei dieser Versuchsanordnung verwendeten Ag-Verbindung* und darf nicht mehr als eine besondere Eigenschaft des Trägers der oligodynamischen Silberwirkung gewertet werden. Ein Beweis hierfür ist auch in dem schon erwähnten Umstande zu erblicken, daß dieser Träger, wenn er in fertiger Lösung (in Form von aktiviertem Wasser) das Innere der Fischblase füllt, die ganze mit ihm in Kontakt stehende Fläche der permeablen Membran gleichmäßig zum Durchtritt benützt und in keiner Beziehung von gelöstem Ag_2O abweicht; nur daß der keimfreie Agarstreifen, der an den äußeren Rand des Dialysiersackes angrenzt, bei der Dialyse von aktiviertem Wasser weit schmäler ausfällt als bei jener von konzentrierter Ag_2O-Solution, ganz entsprechend der Differenz, welche der bactericide Titer der beiden Lösungen bei vergleichender Auswertung aufweist (diese Zeitschr. **106**, 110).

Was das *Inaktivieren* des Silbers *durch Glühen* anlangt, wäre nachzutragen, daß der erwartete Verlust der bactericiden Eigenschaften durch diesen Eingriff auch ausbleiben kann, ja, daß es sogar möglich ist, daß unwirksame oder schwach wirksame Silberstücke hohe Grade von „Aktivität" erwerben, wenn man sie in geeigneter Weise der Flamme exponiert. Es kommt eben auch darauf an, ob die Erhitzung von Reduktions- oder Oxydationsvorgängen begleitet wird; in der *reduzierenden Flamme* des Bunsenbrenners *erlöschen die bactericiden Eigenschaften*, speziell wenn die Erhitzung bis zur Schmelzwärme getrieben wird, während kurzes *Anglühen in starkem Gebläse* umgekehrt früher nicht vorhandene *bactericide* (wasserlösliche) Ag-Verbindungen auf der Metalloberfläche *neu entstehen* lassen kann. Diese diametral entgegengesetzten Resultate gestatten es nicht ohne weiteres, das „Inaktivieren" metallischer Silberflächen durch Glühen als einen rein physikalischen und nur von der angewendeten Temperatur abhängigen Prozeß zu deuten. Man könnte sich nämlich vorstellen, daß metallisches Silber in seiner Grenzfläche gegen Luft eine allmähliche Veränderung (Auflockerung) seines Molekularverbandes erfährt, welche im Bereiche dieser äußersten, sehr dünn zu denkenden Schicht die Lösungstension des Silbers, die sonst fast den Grenzwert Null erreicht, um einen geringen Betrag erhöht. Es wäre dann das Ag-Metall selbst, welches bei der Aktivierung von Wasser oder bei den anderen oligodynamischen Versuchsanordnungen gelöst und zwar kolloidal gelöst würde, und es könnte mit dieser Ansicht vereint werden, daß Ag-Flächen nach Verlust der Grenzschicht unfähig werden, weitere oligodynamische Effekte zu entfalten,

bis sich wieder eine neue Grenzschicht gebildet hat. Daß starkes Glühen oder Schmelzen von Silber sein molekulares Gefüge zu alterieren vermag, muß zugegeben werden, schon mit Rücksicht auf die so merkwürdige Aufnahme von O durch geschmolzenes Silber und die Wiedergabe desselben beim Erstarren (das sogenannte Spratzen). Auch die in Anbetracht der minimalen Substanzmengen außerordentlich hohe bakterientötende Kraft wäre von diesem Standpunkte aus nicht absolut unverständlich. *Cernovodeanu* und *Henry*[1]) haben gezeigt, daß die bactericide Wirkung verschiedener Präparate von kolloidem Silber verschieden ist und daß sie mit abnehmender Größe der im Wasser dispergierten Silberteilchen kontinuierlich wächst; es besteht kein aprioristisches Hindernis, für die oberwähnten hypothetischen Silbergrenzschichten eine molekulare oder fast molekulare Löslichkeit und damit ein Optimum der Bactericidie zu supponieren. Daß derartige „Silbersole" manche Eigenschaften „echter" Lösungen besitzen könnten, bedarf keiner weiteren Auseinandersetzung und so ließe sich selbst die nachgewiesene Dialysierbarkeit und die leichte Diffusibilität der von metallischem Silber an Wasser abgegebenen oligodynamischen Stoffe nicht als Gegenargument verwerten. *Der Umstand jedoch, daß der physikalische Faktor des Erhitzens für die Aufhebung der von Silberflächen ausgehenden bactericiden Wirkung nicht ausschlaggebend ist, sondern daß die begleitenden chemischen Vorgänge das Resultat bestimmen, spricht gegen die erörterte Theorie, ohne sie indes sicher zu widerlegen.*

Will man zu einer Entscheidung gelangen, so erweist es sich als zweckmäßig, die Fragestellung zu präzisieren. Ob die oligodynamischen Lösungen ausschließlich kolloidal verteiltes metallisches Silber oder kolloidale Silberverbindungen oder ob sie lediglich Silbersalze in echter Lösung enthalten oder Gemenge von Metallsolen und Salzlösungen darstellen, trifft nicht den Kern der Sache. Wesentlich ist nur, ob *bloß das Silberion* schädigend, giftig auf die lebende Zelle einwirkt oder ob *auch nichtionisiertes, z. B. molekular- oder gröber disperses Silber* als ein *cytotoxischer* Faktor anzusehen ist. Die Beobachtungen von *Cernovodeanu* und *Henry* tragen zur Beantwortung dieser Alternative nichts bei, da die betreffenden Experimente nicht mit völlig reinen Silbersolen angestellt wurden. Die verschiedenen Präparationen kolloiden Silbers enthalten nämlich immer, wenn auch in sehr wechselnden Mengen, Ag-Ion, welches von der Darstellungsweise der kolloiddispersen Systeme herrührt und bisher weder durch Ultrafiltration noch Dialyse quantitativ abgetrennt werden konnte; da auch eine chemische Methode der quantitativen Erfassung des das Silberkolloid verunreinigenden Ag-Ions fehlte, war nicht einmal eine sichere Aussage über den Grad dieser Beimengung möglich. Erst in neuester Zeit konnten *Gutbier*,

[1]) Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 1906, Nr. 26.

Huber und *Kuppinger* ein Verfahren ausarbeiten, welches es gestattet, bei der Synthese von kolloidem Ag durch Reduktion von Silbernitrat das nicht verbrauchte Silbernitrat nach *Volhard* quantitativ zu titrieren, so daß das rechnungsmäßige Defizit völlig dem im entstandenen Kolloid nachweisbaren Metall entspricht (Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft 1922, Nr. 3, S. 748). Man ist nunmehr in der Lage, Kolloidsysteme mit bekanntem Gehalt an ionisiertem Silber herzustellen und könnte daher durch vergleichende Prüfung der bactericiden Wirkungsstärke verschiedener derartiger Systeme ermitteln, wie weit zellschädigende Funktion, Gehalt an Silberion, Gehalt an kolloiddispersem Silber resp. Dispersitätsgrad des Metalls einander parallel gehen. Äußere Schwierigkeiten hinderten uns indes, solche Untersuchungen in Angriff zu nehmen.

Wir haben einen anderen Weg eingeschlagen. Seit den grundlegenden Arbeiten von *Spiro, Scheurlen* und *Spiro. Krönig* und *Paul* ist es bekannt, daß die Salze vieler Metalle nach Maßgabe ihres Dissoziationsgrades wirken, und daß die desinfektorische Kraft vieler Metallsalzlösungen von der Konzentration der Metallionen entscheidend beeinflußt wird. Komplexe Salze, welche in Lösung ganz oder größtenteils so dissoziieren, daß das Metall nicht als freies Ion abgespalten wird, sondern Bestandteil eines zusammengesetzten Ions bleibt, desinfizieren nur sehr schwach. Als Beispiel dafür bringen *Krönig* und *Paul* gerade das Kaliumsilbercyanid $Ag(CN)_2K$, welches in Wasser sehr leicht löslich ist und sich in das Kation K und das Anion $Ag(CN)_2$ spaltet; seine bactericide Kraft erwies sich gegenüber Milzbrandsporen und Staphylokokken als äußerst gering im Gegensatze zu den Verbindungen, die bei der Dissoziation freie Ag-Ionen liefern ($AgNO_3$, $AgClO_3$, $C_6H_5SO_2OAg$ u. a. m.). Nun entsteht aber das Doppelcyanid $Ag(CN)_2K$ sehr leicht; alle Silberverbindungen können in dasselbe übergeführt werden, wenn man sie im Überschuß von Cyankalium löst. Diese Lösung geht ungemein leicht vonstatten, selbst wenn die Wasserlöslichkeit der benützten Silberverbindung eine so minimale ist wie beim Silberoxyd oder beim Schwefelsilber; darauf beruht ja das Reinigen von „angelaufenem", schwarz gewordenem Silber durch Waschen mit verdünnter (ca. 1%) Kaliumcyanidsolution. Endlich war noch ein drittes Moment für die hier angeführten Versuche von Bedeutung, nämlich daß CNK in den in Betracht kommenden Konzentrationen Bakterien (z. B. Bact. coli) nicht nachweisbar zu schädigen vermag, so daß von der Beseitigung eines CNK-Überschusses abgesehen werden durfte.

Behandelt man Silberstücke, von denen Proben die diversen oligodynamischen Effekte in starker Ausprägung zeigen, mit ca. 1% Cyankaliumlösung, indem man sie in eine solche Lösung für 2—3 Stunden einlegt, spült sie dann mit Leitungswasser ab und untersucht nunmehr ihre Wirkung auf Bakterien, so erweist sich letztere als völlig aufgehoben.

Durch die Einwirkung des Cyankaliums bekommen die Silberflächen einen eigenartigen Glanz und eine merkwürdige Glätte, so daß sie aussehen, als wären sie mit einem farblosen Firnis überzogen; entfernt man mechanisch diese Schicht (durch Abziehen mit Glaspapier), so ändert das nichts an dem vollständigen Mangel jeder zellschädigenden (abtötenden, entwicklungshemmenden) Wirkung. Erst der längere Kontakt mit der Luft (vgl. diese Zeitschr. **113**, 58) vermag die bactericide Kraft zu regenerieren.

Das Ergebnis entsprach somit der Erwartung, die man hegen durfte, wenn für die oligodynamische Aktivität tatsächlich nur die den scheinbar blanken Metallflächen aufgelagerten, wasserlöslichen und in wässeriger Lösung Ag-Ion spaltenden Silberverbindungen in Betracht kommen. *Dies wurde noch deutlicher, wenn man versuchte, die bactericide Kraft einer fertigen oligodynamischen Lösung („aktivierten" Wassers) durch Zusatz von Cyankalium aufzuheben;* dies mußte — die Richtigkeit der zugrundeliegenden Annahme vorausgesetzt — gelingen, was auch de facto der Fall war, wie der nachstehende Versuch lehrt. Es schien dabei von Interesse, die oligodynamische Flüssigkeit mit einer konzentrierten Ag_2O-Lösung zu vergleichen und zwar sowohl hinsichtlich der Intensität der Bactericidie als auch mit Rücksicht auf die zur Aufhebung derselben erforderlichen Cyankaliummengen.

Versuch: Die oligodynamische Lösung wurde durch 2tägiges Einlegen von Ag-Stücken in destilliertes Wasser hergestellt. — Die Ag_2O-Lösung wurde durch Eintragen von chemisch reinem Ag_2O im Überschuß in 1 Liter destillierten Wassers bereitet; durch Einstellen des Glaskolbens in den Dampfkochtopf suchten wir die Lösung des Silberoxydes zu beschleunigen und filtrierten hierauf durch Papier.

Der eigentliche Versuch war so eingerichtet, daß jedes Röhrchen 6 ccm Flüssigkeit enthielt; die eingesäten Bakterienmengen betrugen 1 Normalöse einer Suspension von Colibacillen, erhalten durch Abschwemmen einer 24stündigen Schrägagarkultur mit 7 ccm destillierten Wassers. Die Bakterien blieben mit den auf ihre Bactericidie zu prüfenden Flüssigkeiten 8 Stunden bei 18° in Kontakt; sodann wurde je eine Öse des bakterienhaltigen Gemenges auf der Oberfläche eines Schrägagarröhrchens sorgfältig ausgebreitet; die Agarröhrchen kamen für 16 Stunden in den Thermostaten, sodann wurde das Resultat abgelesen. (θ = kein Wachstum, 2 K = 2 Kolonien, R = zusammenhängender Rasen.)

a) Wirksamkeit der oligodynamischen Flüssigkeit.

Um diese zu titrieren, wurde das aktivierte Wasser fortschreitend (mit dest. Wasser) verdünnt, die Verdünnungen mit je 1 Öse Colisuspension beimpft und von diesen Verdünnungen nach 8 Stunden Abimpfungen auf Schrägagarröhrchen vorgenommen.

Verdünnung:	Wachstum:
konzentriert	θ
1 : 2	1 K.
1 : 4	4 K.
1 : 8	R.
1 : 16	R.

b) Wirksamkeit der konzentrierten Ag_2O-Lösung [wie sub a)].

Verdünnung:	Wachstum:
konzentriert	θ
1 : 2	θ
1 : 4	θ
1 : 16	θ
1 : 32	θ
1 : 100	θ
1 : 500	R.
1 : 1000	R.

c) Erforderliche CyK-Menge zur Neutralisation der oligodynamischen Flüssigkeit, d. h. der in 5 ccm derselben enthaltenen wirksamen Substanz.

Jedes Röhrchen wurde mit 5 ccm oligodynamischer Flüssigkeit, mit fallenden Mengen 1 proz. Cyankaliumlösung und mit soviel destilliertem Wasser gefüllt, daß das Gesamtvolum 6 ccm betrug; Einsaat von 1 Öse Colisuspension und nach 8stündiger Einwirkungsdauer Abimpfung auf Schrägagar.

Menge des zugesetzten CyK in ccm der 1 proz. Lösung:	Wachstum:
1,0	R.
0,5	R.
0,1	R.
0,01	R.
0,001	R.
0,0001	2 K.
0,00001	θ
0,000001	6 K.
0,0000001	θ

d) Erforderliche CyK-Menge zur Neutralisation von 5 ccm konzentrierter Ag_2O-Lösung, ermittelt wie sub c).

Menge des zugesetzten CyK in ccm der 1 proz. Lösung:	Wachstum:
1,0	R.
0,5	R.
0,1	R.
0,01	θ
0,001	1 K.
0,0001	θ
0,00001	θ

Die oligodynamische Lösung wirkte also 25—100 mal schwächer bactericid als die konzentrierte Silberoxydlösung und erforderte dementsprechend auch ca. 100 mal weniger Cyankalium zur kompletten Neutralisation ihrer keimtötenden Wirkung. Eine absolute Übereinstimmung der Werte war von vornherein nicht sehr wahrscheinlich und hatte für unsere Zwecke auch keine besondere Bedeutung, so daß wir von einer Verfeinerung der Titrationen Abstand nahmen.

Zweifellos ergibt sich aber aus diesen Experimenten zunächst wieder eine Stütze für die chemische Theorie der oligodynamischen Phänomene

und ein neues Argument gegen die u. E. definitiv abzulehnende Fernwirkung *Saxls*. Auf diesen Standpunkt stellen sich übrigens nahezu alle neueren Autoren, von denen wir hier nur *Wernicke* und *Sordelli* hervorheben, welche für Cu den Nachweis zu führen vermochten, daß Wasser, welches mit dem Metall oder mit seinen Oxyden in Kontakt gestanden hat, nur dann bactericide Eigenschaften zeigt, wenn es tatsächlich das Metall in solcher Menge aufnehmen konnte, daß die *Röhmann-Spitzer*sche Cu-Reaktion ein deutlich positives Resultat liefert. Geht das Cu nicht in Lösung, so bleibt auch die Aktivierung des Wassers aus und zwar selbst dann, wenn der Kontakt mit dem Metall über 2 Monate währt.

Dagegen kann aus der *Neutralisierbarkeit der Oligodynamie* von Metallflächen oder von aktiviertem Wasser *durch Cyankalium* nicht direkt der Schluß abgeleitet werden, daß die oligodynamischen Effekte auf Silberionen und nicht auf der Anwesenheit von molekular oder gröber dispersem Silber beruhen. Denn Cyankalium löst auch metallisches Silber unter Entstehung von $Ag(CN)_2K$, allerdings nur unter Mitwirkung von Luft, deren O offenbar in die Reaktion eingeht. So löst sich eine Silberfolie, auf der Oberfläche einer Cyankaliumlösung schwimmend, sehr rasch; und im Dunkelfeld kann man direkt beobachten, wie die tanzenden, verschieden gefärbten Partikel eines Silbersols beim Zusatz von Kaliumcyanid ihre Farben verändern, an Zahl abnehmen und allmählich verschwinden; bei makroskopischer Betrachtung sieht man, wie das dunkelbraunschwarze Sol durch das Kaliumcyanid grün, dann hellgelb wird, um sich schließlich in eine ungefärbte, wasserklare Flüssigkeit zu verwandeln.

Die Auffassung der *Oligodynamie als Funktion der Silberionen* läßt sich jedoch mittelbar aus dem Antagonismus der CNK folgern, wenn man die letzgenannte Tatsache mit den Ergebnissen der Arbeiten von *Paul* und *Krönig* zusammenhält, demzufolge gerade bei den Silbersalzlösungen die bakterientötende Kraft direkt abhängig ist von der Konzentration der Ag-Ionen. *Bei den Lösungen bekannter Silberverbindungen* (Ag_2O, $AgNO_3$) *liegt die Sache zweifellos so, daß die Aufhebung der desinfektorischen Fähigkeit durch CNK-Zusatz den biologischen Ausdruck der Umwandlung von wirksamen Ag- in unwirksame* $Ag(CN)_2$*-Ionen darstellt; wenn wir nun sehen, daß CNK aktiviertes Wasser in gleichem Sinne beeinflußt und daß die zur Aufhebung seiner Baktericidie nötigen Mengen des Cyanids der geringen Intensität der Bactericidie völlig angemessen sind, so darf man wohl auch in diesem Falle den gleichen Prozeß annehmen und folglich das* ***aktivierte Wasser*** *seinem Wesen nach als die* ***Lösung einer ionisierten Silberverbindung*** *betrachten.*

Daß destilliertes Wasser von Silberflächen Silberion (und nicht kolloides Silber) aufnimmt, haben übrigens *Hönigschmid* und *Birken-*

bach auf chemischem Wege konstatiert (Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch., 1921, Nr. 8, S. 1883). Bei ihren Untersuchungen über das Atomgewicht des Wismuts benützten sie destilliertes Wasser, welches mit etwas saurem Kaliumsulfat mittels eines Silberkühlers in ausgedämpfte Glaskolben aus Jenaglas destilliert wurde; der Kühler war direkt in den verengten Hals des Destillationskolbens eingesetzt. Unstimmigkeiten zwischen Titrationen und gravimetrischen Bestimmungen bei der Analyse der Wismuthalogenide veranlaßten sie, an der Reinheit des destillierten Wassers zu zweifeln, obwohl Silberkühler ganz allgemein für die Herstellung von Leitfähigkeitswasser von Physikochemikern empfohlen werden. In der Tat rief eine Lösung von Chlorion eine im Nephelometer deutlich sichtbare Opalescenz hervor, die auf der Fällung von in Ammoniak löslichem Silberchlorid beruhte. 21 differente Proben des destillierten Wassers, welche ebensoviel Destillationen entsprachen, enthielten 0,12—0,26 mg Ag im Liter (durchschnittlich 0,2 mg[1]); die Bestimmung des Ag-Gehaltes erfolgte nephelometrisch durch Vergleich mit normierten Ag-Lösungen. Nach Blankspülung des Silberkühlers mit warmer KCN-Lösung und bei Vornahme der Destillation in einem von den übrigen Arbeitsräumen entfernten Lokal sank der Ag-Gehalt des Destillates auf 0,04 mg pro Liter ab. *Hönigschmid* und *Birkenbach* warnen auf Grund ihrer Erfahrungen vor dem Gebrauch von Silberkühlern zur Herstellung von reinstem Wasser; die Ursache der Abgabe von Ag-Ion an das destillierte Wasser suchen sie in der Einwirkung der Laboratoriumsluft auf das metallische Silber, ohne sich näher über die Art dieser Einwirkung zu äußern. Sie meinen aber offenbar nicht die normalen Bestandteile der atmosphärischen Luft, sondern die in chemischen Laboratorien möglichen Verunreinigungen, da sie die Destillation in andere Räumlichkeiten verlegten (ohne freilich die Aufnahme von Ag-Ion durch das sich kondensierende Wasser auf Null herabdrücken zu können.)

Darf es somit als gesichert gelten, daß die oligodynamischen Erscheinungen, soweit sie von Silber ausgehen, nicht auf der Abspaltung kolloiden Silbers oder kolloidaler Ag-Verbindungen, sondern auf der

---

[1]) Es ist gewiß sehr auffällig, daß dieser Wert der Größenordnung nach den Voraussetzungen entspricht, die sich aus den früheren Versuchen von *Doerr* und den vorliegenden Resultaten ergeben. Silberoxyd löst sich bei 25° in einem Liter Wasser in der Menge von $2{,}2 \cdot 10^{-4}$ Grammatomen Silber (vgl. *Hofmann*, Lehrb. d. anorgan. Chemie, S. 540), was 0,02 g ausmacht. Nun kann man andererseits feststellen, daß die oligodynamischen Lösungen (durch Ag-Kontakt aktivierte Proben destillierten Wassers) etwa hundertmal schwächer bactericid wirken als konzentrierte Lösungen von Ag_2O und daß sie etwa hundertmal weniger CyK zu ihrer Neutralisation benötigen; man würde daher einen hundertmal kleineren Gehalt an Silberion, d. h. 0,0002 g im Liter erwarten. Das ist aber eben die von *Hönigschmid* und *Birkenbach* ermittelte Zahl.

Abgabe von Silberionen oder ionisierbaren Silberverbindungen beruhen müssen, so bleibt es doch vorderhand unklar, *auf welchem Wege* bzw. durch Vermittelung welcher Zwischenstufen und unter welchen Bedingungen sich der *Übergang von metallischem Silber in Silberion* vollzieht.

Doerr hat (diese Zeitschr. **113**, 58) nachgewiesen, daß geglühtes und durch Glühen unwirksam gewordenes Silber die bactericide und hämolytische Wirkung wiedergewinnt, wenn es längere Zeit an der Luft liegen bleibt; unter flüssigem Paraffin blieb diese Regeneration aus, welche auf die Bildung löslicher Silberverbindungen an der Metalloberfläche durch die oxydierenden Einflüsse der Atmosphäre bezogen wurde. Schon früher war gezeigt worden, daß auch Säuren (H-Ionen) das Reaktivieren resp. Aktivieren unwirksamer Ag-Flächen herbeiführen; die Aktivierung durch stark dissoziierte Säuren verlief dabei wesentlich rascher als jene durch Luft und beanspruchte unter Umständen nur wenige Minuten, während Zimmerluft erst in Monaten einen Effekt erkennen ließ. Doch wirkten auch schwache Säuren wie CO_2 noch erheblich intensiver und schneller als die bloß 0,03% Kohlensäure enthaltende Luft ventilierter Räume. Diese Untersuchungen wurden natürlich fortgesetzt, insbesondere in der durch die bereits erzielten Ergebnisse automatisch bedingten Richtung, *welcher Bestandteil der Luft* an der Entstehung der wirksamen Ag-Verbindungen beteiligt ist, und zweitens auch, um Aufschlüsse über die *chemische Natur* dieser Verbindungen zu erhalten.

Inzwischen haben *Wernicke* und *Sordelli*[1]) (in Kenntnis der von *Doerr* mitgeteilten Versuchsresultate) diesen Teil des Problems aufgegriffen und für das Cu bearbeitet. Sie stützen sich zunächst auf zum Teil ältere Publikationen, denen zufolge Cu in Wasser nur dann löslich ist, wenn O (oder oxydierende Substanzen) und gleichzeitig H-Ionen anwesend sind; in Gegenwart von O_2 verwandelt sich Cu in die Cu-Oxyde, die aber von Wasser gleichfalls nicht angegriffen werden und nur in Lösung gehen, wenn H-Ionen (Säuren einschließlich CO_2, saure oder hydrolisierte Salze) dies ermöglichen. Mit einer geeigneten Versuchsanordnung unterzogen *Wernicke* und *Sordelli*[1]) diese Aufgabe einer Nachprüfung, indem sie Cu, CuO und Cu_2O mit Wasser und Luft resp. reinem H_2, O_2, reiner CO_2 oder mit Kombinationen dieser Gase in Kontakt brachten. Eine Aktivierung des Wassers und ein gleichzeitiges Positivwerden der *Röhmann-Spitzer*schen Reaktion erfolgte nur in vier Fällen (je eine Probe), nämlich bei:

---

[1]) Anales de la Asociacion Quimica Argentina **9**, 145 (daselbst auch eine ausführliche Besprechung der einschlägigen Literatur) und Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **1921**, S. 317.

$Cu + H_2O$ + Luft	innerhalb von 2 Tagen,		
$CuO + H_2O + CO_2$	„ „ 26 „		
$Cu + H_2SO_4 + O_2$	„ „ 61 „	und	
$Cu + H_2O + O_2 + CO_2$	„ „ 61 „		

Die Kombinationen:

$Cu + H_2O + H_2$	(3 Proben),
$Cu + H_2O + O_2$	(3 „),
$CuO + H_2O + O_2$	(2 „) und
$Cu_2O + H_2O + H_2$	(1 „)

lieferten negative Befunde. Wie man sieht, fehlen einige Kontrollkombinationen; auch bemerken die genannten Autoren, daß sie bei manchen Experimenten abweichende (nicht näher angeführte) Resultate erhielten, welche sie irgendwelchen technischen Mängeln der Versuchsanordnung zuschreiben möchten und über die sie genauere Studien in Aussicht stellen. Sie kommen jedoch bereits auf Grund ihrer bisherigen Erfahrungen zu der Feststellung, daß Cu durch destilliertes Wasser nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von O_2 und CO_2 gelöst wird; da aber diese Stoffe stets in der Luft vorkommen, so erkläre sich, warum Cu unter den Bedingungen, unter welchen man bisher experimentiert hat, stets das wässerige Medium, mit dem es in Kontakt war, zu aktivieren, bactericid zu machen vermochte.

Ohne auf eine ausführliche Diskussion der interessanten Ergebnisse von *Wernicke* und *Sordelli* einzugehen, die in vielen und wesentlichen Punkten eine Bestätigung der von *Doerr* vertretenen Auffassung der Oligodynamie enthalten, darf wohl an dieser Stelle betont werden, daß sich die mit Cu gemachten Beobachtungen, auch wenn sich ihre Gültigkeit vollinhaltlich herausstellen sollte, nicht schematisch auf das Ag übertragen lassen. Dem steht schon die Tatsache hindernd im Wege, daß das Silberoxyd in reinem Wasser in angebbarer Menge löslich ist, während CuO und Cu_2O als praktisch unlöslich betrachtet werden; dementsprechend wurde auch in den Versuchen von *Wernicke* und *Sordelli* Wasser durch Kontakt mit CuO oder Cu_2O (in CO_2-freier Atmosphäre) nicht aktiviert, während Ag_2O destilliertes Wasser (bei Luftabschluß) rasch in eine relativ stark desinfizierende Flüssigkeit verwandelt. Diese Differenz muß selbstverständlich den Verlauf der Überführung von Cu resp. Ag in dissoziierbare Verbindungen beeinflussen.

Bisher konnten wir nur Versuche anstellen, bei denen durch Cyankalium unwirksam gemachtes Ag-Blech in zugeschmolzenen Glasröhren verschiedenen Gasen (O_2, H_2, CO_2) und Gasgemischen (Luft, Luft minus O, Luft minus CO_2, Luft minus H_2S)exponiert wurde, wobei die Gase und Gasgemische entweder feucht (mit Wasserdampf gesättigt) oder trocken (Adsorption des Wasserdampfes durch $CaCl_2$) zur Anwendung kamen. Einige Stücke des Ag-Bleches wurden offen in der Laboratoriumsluft liegen gelassen und von Zeit zu Zeit eines auf seine oligodynamische

Wirkung (durch Einbetten in eine mit Coli beimpfte Agarplatte) geprüft; diese erwiesen sich am 7., 17. und 27. Tage als unwirksam und bildeten erst am 40. Tage schmale, zarte wachstumsfreie Zonen. Gerade so stark wie Zimmerluft wirkte in derselben Zeit trockene Luft, Luft minus O, Luft minus CO_2, schwächer Luft minus H_2S; in einer H_2-Atmosphäre blieben die Ag-Stücke völlig unwirksam, gleichgültig, ob trockener oder wasserdampfhaltiger H_2 auf die Metallflächen einwirkte. Viel stärker und auch weit rascher als durch Luft wirkte eine *CO_2-Atmosphäre* (trocken oder feucht) sowie eine *Atmosphäre von reinem, trockenem O_2*; die in diesen Gasen aufbewahrten Ag-Stücke umgaben sich auf der Agarplatte mit mehrere Millimeter breiten Höfen. Eine Unstimmigkeit hatten auch wir zu verzeichnen, indem eine feuchte O-Atmosphäre in einem Versuch nicht zu aktivieren vermochte. Indes sind diese Untersuchungen noch nicht zum Abschlusse gelangt und hier nur mit Rücksicht auf die Publikation von *Wernicke* und *Sordelli* erwähnt worden.

Die Frage, ob die Wirksamkeit des durch Ag aktivierten Wassers auf *einer* bestimmten Ag-Verbindung beruht oder ob die bactericiden Ag-Ionen durch sehr *verschiedene* dissoziierbare Ag-Verbindungen geliefert werden können, bleibt vorderhand unentschieden. Für beide Möglichkeiten existieren Anhaltspunkte.

Zusammenfassung.

1. Mit Cyankaliumlösung behandelte Silberflächen verlieren ihre vorher vorhandene keimtötende Wirkung; Cyankalium hebt ferner die bactericiden Kräfte des durch Ag aktivierten Wassers auf.

2. Dieser Antagonismus beruht, wie der Vergleich mit den Eigenschaften bekannter Silbersalze lehrt, auf der Überführung der zellschädigenden Ag-Ionen in unwirksame $Ag(CN)_2$-Ionen. Das *wirksame Prinzip* in den verschiedenen Formen des oligodynamischen Versuches ist also Silber*ion*; damit steht die Dialysierbarkeit und die Diffusibilität der oligodynamischen Silberverbindung in Einklang sowie der von *Hönigschmid* und *Birkenbach* erbrachte Nachweis, daß Wasser, welches mit Silberflächen in Kontakt war, eine nephelometrisch konstatierbare Chlorreaktion gibt.

3. Für die bactericide Kraft von reinem kolloidem Silber (ohne Beimengung von Ag-Ion) besteht kein sicherer Beweis.

4. Die bactericiden Fähigkeiten von Silberflächen entstehen durch Einwirkung der Luft auf das Metall; als wirksame Faktoren der Luft sind die CO_2 und der O_2 anzusehen, da beide im konzentrierten Zustande rascher und intensiver das Metall angreifen als die Luft.

Milchsäuregärung der Glucose durch Peptone.

Von

Gottfried Schlatter.

(Aus dem Physikalisch-chemischen Institut der Eidgenössischen technischen Hochschule, Zürich.)

(Eingegangen am 21. April 1922.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Die nachfolgende Untersuchung ist eine Fortsetzung der vor Jahresfrist von *Emil Baur* und *E. Herzfeld*[1]) mitgeteilten Versuche, die als „Gärung ohne Hefe" bezeichnet worden waren. Es wurde von den Autoren gezeigt, daß in Zucker-Peptonlösungen unter gewissen Bedingungen eine Gärung des Zuckers einsetzt. Dieselbe lieferte zum größten Teil eine Säure, wahrscheinlich Milchsäure, und zum kleineren Teil, nämlich zu etwa 5% der gesamten Zersetzung, eine jodoformgebende Substanz, wahrscheinlich Alkohol, so daß man das Vorliegen einer gemischten, teils milchsäurebildenden, teils alkoholischen Gärung behaupten durfte. Die Autoren haben nach einem derartigen Effekt gesucht, indem sie sich von der Vorstellung leiten ließen, daß fermentierende Systeme durch eine geeignete Mischung sonst wohlbekannter Stoffe aufgebaut werden könnten. Denn nachdem *E. Herzfeld*[2]) nachweisen konnte, daß man Fermente mit peptischen und tryptischen Eigenschaften durch Mischung von Aminosäuren und Polypeptiden bereiten kann, war es naheliegend, auch für andere Gärungen, als für Proteolysen, die Annahme zu machen, daß die entsprechenden Fermente nicht sowohl Stoffe von unbekannter Zusammensetzung enthielten, an denen ihre Wirkung haftete, sondern daß ein Ferment aus analytisch längst bekannten Bestandteilen besteht, seine Wirkung aber nur in einem ganz bestimmten Mischungs- und Zerteilungszustand auszuüben vermag. Dann sollte es möglich sein, derartige wirksame Mischungen künstlich zu bereiten. Indem *Emil Baur* und *E. Herzfeld* diesen Weg einschlugen,

---

[1]) Diese Zeitschr. **117**, 96. 1921.
[2]) Diese Zeitschr. **68**, 402. 1915.

erhielten sie die genannten sucroclastischen Effekte, wenn sie in bicarbonatalkalischer Lösung Peptone und gallensaure Salze auf Traubenzucker einwirken ließen.

Die Versuche der Autoren waren mehr vorläufiger Art. Nach verschiedener Richtung forderten sie dazu auf, ins Einzelne verfolgt zu werden. Auf Anregung der Autoren habe ich es unternommen, die Versuche wenigstens nach einer bestimmten Richtung hin auszubauen. Es gelang mir, eine quantitative Vergärung des Traubenzuckers zu Milchsäure zu verwirklichen. Der Bereich meiner Untersuchung erstreckt sich auf die Durcharbeitung dieser Reaktion.

Vorbereitende Versuche.

Baur und *Herzfeld* haben mit zwei verschiedenen Peptonen gearbeitet, mit Pepton *Witte* und mit Pepton *Siegfried* (von A. G. vormals *B. Siegfried*, Zofingen, Schweiz). Die beiden Peptone verhielten sich verschieden, insofern als das letztere die Gärung rascher einleitete. Zusatz von gallensauren Alkalien hielten sie unter allen Umständen für unerläßlich. Hierzu ist aber zu bemerken, daß sich die Autoren auf Entbindung von Kohlendioxyd für sich allein nicht verließen, da auch im Blindversuch (d. h. wenn kein Zucker zugegen ist) eine solche eintreten kann, wenn genügende Mengen von Pepton und Bicarbonat genommen werden. Vielmehr hielten sie eine Gärung erst dann für gegeben, wenn die Jodoformprobe positiv ausfiel.

Den Umfang der Jodoformbildung hatte ich zunächst nachzuprüfen. Hierbei mußte ich die Erfahrung machen, daß die Bereitung gleich wirksamer Gallensalzfraktionen, wie sie *Baur* und *Herzfeld* zur Verfügung standen, auf Schwierigkeiten stieß. Nach der von den Autoren gegebenen Vorschrift[1]) verfahrend, bekam ich aus 500 g Rindergalle in der ätherunlöslichen Fraktion 37 g und in der ätherlöslichen Fraktion einige Gramme gallensaure Alkalien als hellgelbes Pulver. Die letztere Fraktion sollte die wirksame sein.

Indessen verhielten sich meine beiden Präparate gleich, nämlich so, daß die Jodoformreaktion stets nur schwach blieb, wenn auch, nach der Entbindung von Kohlendioxyd beurteilt, ein unzweifelhafter Gäreffekt vorlag. Zum Gelingen des Versuches hielten es *Baur* und *Herzfeld* für nötig, daß Zucker, Pepton und Bicarbonat unter dem Pistill zusammengerieben und in der frischbereiteten wässerigen Lösung von Gallensalzen unter Umrühren mit dem Pistill rasch aufgelöst werden. Diese Vorschrift genau einhaltend, bekam ich bei Variation der Pepton- und Bicarbonatmenge die Vergärungswerte der folgenden Tabelle I.

Der Versuch besteht darin, daß mit den in der Tabelle angegebenen Mengen von Pepton *Witte* und Bicarbonat je 2 g Traubenzucker (pu-

[1]) l. c. S. 101.

rissimum, wasserfrei, *Merck*) verrieben und in 10 ccm der 1 proz. Gallensalzlösung gelöst werden. Die Lösungen kommen in graduierte Saccharimeter und werden bei 37° in den Brutschrank eingestellt. Die freie Oberfläche in der Ampulle ist zweckmäßig mit Toluol zu überschichten. Zu jeder Probe gehört eine gleiche ohne Zucker. Die in dieser entwickelte Kohlensäure wird von der in der Hauptprobe entwickelten abgezogen. Die Unterschiede, gemessen in Kubikzentimeter, sind die in der Tabelle verzeichneten Werte.

Tabelle I.

Bicarbonat g	Pepton *Witte* in g 1,0 g ccm	0,5 g ccm	0,2 g ccm	0,1 g ccm	Beginn nach Tagen	Dauer in Stunden
1,0	2,5	1,1	0,6	0,1	sofort	4
0,5	1.4	0.2	0,1	0.1	„	4
0,2	5,6	6.0	5.6	5,5	2—4	2 Tage
0,1	6,2	5,1	5,0	6.0	3—6	2 „

Für die dritte und vierte Zeile ist die abzuziehende Menge 0, für die erste und zweite geht sie bis 1,3 ccm im Höchstfalle. Man erkennt einen schädlichen Einfluß einer zu hohen Salzkonzentration, dergestalt, daß deutliche Gäreffekte vielleicht mit Ausnahme der ersten Spalte, nur bei den Proben der dritten und vierten Zeile zu verzeichnen sind.

Die vergorenen Lösungen wurden nun angesäuert, mit wasserfreiem Natriumsulfat übersättigt, ein Teil abdestilliert und im Destillat die Jodoformprobe angestellt. Diese fiel nun wohl insoweit positiv aus, als Jodoform durch den Geruch deutlich wahrnehmbar wurde, während dies bei den blinden Proben nicht der Fall war; aber es war klar, daß im Vergleich mit der entwickelten Menge Kohlendioxyd die auf Alkohol zu beziehende Jodoformbildung nur den Charakter einer quantitativ ganz unbedeutenden Nebenreaktion besitzt.

Dasselbe Bild bekam ich auch, wenn das *Witte*-Pepton durch das Pepton *Siegfried* ersetzt wurde: undeutliche Gärwirkung in ungefähr gesättigter Bicarbonatlösung, deutliche in verdünnter, immer aber nur Spuren von der jodoformbildenden Substanz. Das Pepton *Siegfried* hat den Vorzug vor dem Pepton *Witte*, daß die Gärung rascher eintritt. Bei dem letzten muß es bedenklich erscheinen, daß die Gärung in den eigentlich allein in Betracht kommenden, an Bicarbonat verdünnten Lösungen erst nach 2 oder mehreren Tagen einsetzt. Um den Einwand möglicher Bakterientätigkeit zu begegnen, mußte man, vorläufig wenigstens, auf möglichst prompte Wirkung bedacht sein. Solche erreicht man mit dem Pepton *Siegfried*, z. B. gibt 1 g Pepton *Siegfried*, 2 g Glucose, 0,1 g Natriumbicarbonat in 10 ccm 1 proz. Gallensalzlösung aufgelöst, in 6—8 Stunden 5—6 ccm CO_2, während im Blindversuch durch die Säurenatur des Peptons etwa 1 ccm CO_2 entbunden werden.

Die sofort einsetzende Säurebildung fällt in die Augen. Es wird später nachgewiesen, daß diese Säure Milchsäure ist. Sie setzt eine ihr äquivalente Menge Kohlensäure aus dem Bicarbonat in Freiheit. Hierdurch wird der Verlauf bequem quantitativ verfolgbar. Aber die Jodoformreaktion bleibt viel schwächer als in den von *Baur* und *Herzfeld* mitgeteilten Versuchen.

Das nächstliegende war, zu versuchen, durch Variation der Gallensalzmenge diesem Mangel abzuhelfen. Dieses gelang nun zwar nicht, dafür stellte sich heraus, daß für die Milchsäuregärung, die in den hier behandelten Versuchen sehr nahezu rein auftritt, das *Gallensalz ganz entbehrlich* ist.

Gleichzeitig fällt eine andere Beschränkung fort; nämlich die Notwendigkeit, Pepton, Bicarbonat und Zucker erst zu verreiben und dann gemeinsam zu lösen. Vielmehr bekommt man die Milchsäuregärung auch dann, wenn die Stoffe, die zum Zustandekommen des gärkräftigen Systems notwendig sind, einzeln in Wasser aufgelöst und in beliebiger Reihenfolge vereinigt werden.

Daß zum Zustandekommen des beobachteten Effektes keiner der drei Bestandteile fehlen darf, wurde vielfach geprüft. Die folgende kleine Tabelle II gibt ein Beispiel:

Tabelle II.

In 10 ccm sind gelöst			
Pepton *Siegfried* g	Traubenzucker g	Natrium-bicarbonat g	CO_2 ccm
1	2	0	0*)
1	0	0,1	0
0	2	0,1	0
1	2	0,1	4

*) Gibt nach 24 Std. mit Bicarbonat versetzt, nicht sofort Gasentwicklung.

Nach diesen Feststellungen ließ ich die Frage nach den für ein stärkeres Hervortreten der alkoholischen Gärung nötigen Bedingungen fallen und beschränkte mich auf die Untersuchung der ohne Gallensalze so gut wie rein einsetzenden Milchsäuregärung der Glucose. Dieses Vorgehen empfiehlt sich wegen der Einfachheit des zu behandelnden Systems sowohl in bezug auf Zusammensetzung, wie in bezug auf den stofflichen Umsatz.

Konzentrationsabhängigkeit und ungefährer zeitlicher Verlauf.

Nachdem das Pepton *Siegfried* sich dem Pepton Witte weit überlegen gezeigt hat, wird die Konzentrationsabhängigkeit mit dem ersteren allein untersucht. Abgewogene Mengen der drei Bestandteile werden

in je 10 ccm destilliertem Wasser gelöst, in Saccharimeter gefüllt und die Gasentwicklung im Brutschrank bei 37° gemessen. Anfang und Ende, sowie der zeitliche Anstieg im groben Umriß werden vermerkt. Das Ende der Gärung fällt zusammen mit einer Ausflockung des Peptons; während der Gasentwicklung trübt sich die zunächst fast klare Gärlösung. Bei konstant gehaltenem Zuckergehalt (2 g Glucose auf 10 ccm Wasser) ergibt sich das Bild der Tabelle III und zugehörigen Kurventafel, Abb. 1a und 1b.

Tabelle III.

10 ccm enthalten 2 g Traubenzucker und				
Bicarbonat g	Pepton *Siegfried* 1,0 g ccm	0,5 g ccm	0,2 g ccm	0,1 g ccm
1,0	0	0,5	0,5	0,7
0,5	0,3	0,9	1,9	1,9
0,2	2,0	3,6	5,0	5,0
0,1	4,0	4,8	5,0	5,0
Beginn nach Stunden:	sofort	ca. 2	ca. 14	ca. 16

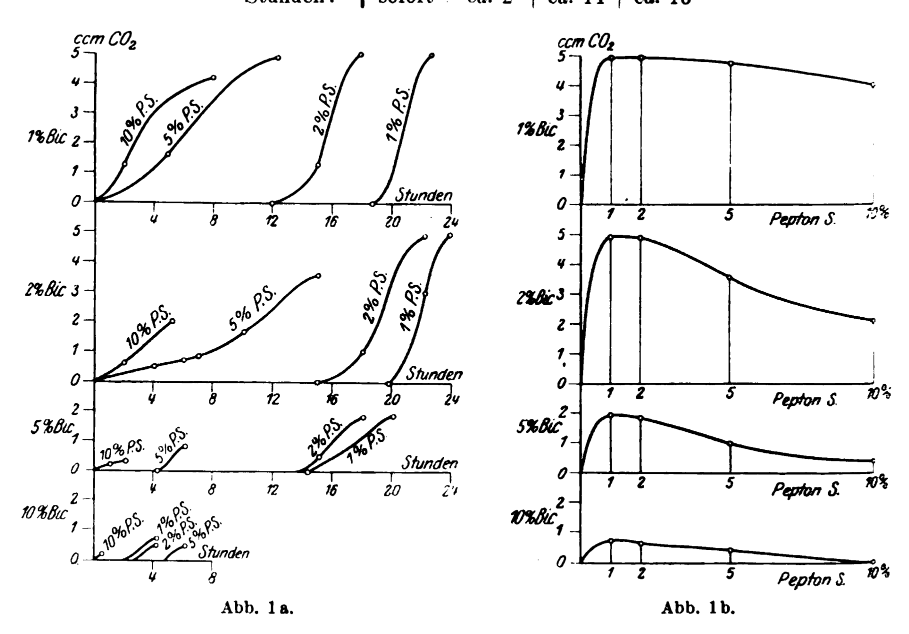


Abb. 1a. Abb. 1b.

Die Zahlenwerte der Tabelle bedeuten Kubikzentimeter CO_2, abzüglich derjenigen Mengen, die gleichzeitig im Blindversuch ohne Zucker erhalten werden. In den Versuchen der dritten und vierten Zeile der Tabelle war nichts abzuziehen, in denjenigen der beiden ersten Zeilen

wechselnde Mengen bis 2,5 ccm, steigend mit der Pepton- und Bicarbonatmenge. Diese Gasentbindung kommt nur von der Neutralisation des Peptons. Die Mehrzahl der Versuche ist doppelt oder dreifach ausgeführt worden. Die Abweichung der Einzelwerte ist nicht größer als das nur annähernd genaue Meßverfahren festzustellen gestattet.

Man erkennt folgendes:

a) Wachsende Konzentration des Bicarbonats verringert das Ausmaß des Umsatzes. 1% Bicarbonat ist ungefähr das Optimum. Unterhalb $^1/_2$% erlischt die Wirkung rasch.

b) Auch die Peptonmenge hat bei ungefähr 1% ihr Optimum. Es ist aber viel flacher, namentlich bei der optimalen Bicarbonatkonzentration (1%).

c) Der Beginn der Gasentwicklung tritt um so später ein, je weniger Pepton vorhanden ist. Der Verlauf der Gärung hat einen deutlich autokatalytischen Verlauf, d. h. die Gasentwicklung setzt langsam ein, wird dann rascher, um bei eintretender Flockung ziemlich plötzlich zum Stillstand zu kommen. Da die Gasentwicklung erst dann einsetzen kann, nachdem die Lösung an Kohlendioxyd etwas übersättigt ist, so bedeutet die Inkubationszeit bei den geringeren Pepton *S.*-Gehalten nicht etwa, daß die Zuckerzersetzung erst nach so viel Stunden anfängt, sondern nur, daß sie solange sehr geringfügig geblieben ist.

Sowohl die Umsatzgröße, als der zeitliche Verlauf der Gärung, ist von der Konzentration des Peptons und Bicarbonats in ganz gesetzmäßiger Weise abhängig und vollkommen reproduzierbar. Dies beweist, daß Pepton und Bicarbonat in ihrer Kombination die wirklichen Ursachen der Milchsäuregärung des Traubenzuckers sind.

Nun ist noch der Einfluß der Konzentration des Zuckers festzustellen. Die folgende Tabelle IV enthält die diesbezüglichen Versuche; zugleich sind in ihr noch Versuche mit weniger als 1% Pepton und Bicarbonat aufgenommen.

Tabelle IV.

	10 ccm enthalten			
	0,1 g Pepton *Siegfried*		0,05 g Pepton *Siegfried*	
Traubenzucker g	0,1 g Bic. ccm	0,05 g Bic. ccm	0,1 g Bic. ccm	0,05 g Bic. ccm
1,0	6,2	3,4	4,8	2,5
0,5	4,7	5,0	6,8	2,2
0,25	5,1	3,7	6,2	3,3
0,1	6,5	2,6	4,2	3,3
0,05	3,0	3,5	1,9	2,2

Man sieht, daß herab bis zu 1% Zucker kein deutlicher Gang der Gärungswerte auftritt. Erst bei $^1/_2$% bemerkt man ein Nachlassen. Es

ist also das Ausmaß der Gärung in weiten Grenzen unabhängig vom Zuckergehalt.

Weiter unten wird gezeigt werden, daß bis zu einem Gehalt von 1—2% der Zucker erschöpfend vergoren werden kann.

Der genaue zeitliche Verlauf der Gärung.

Nach dem vorhergehenden Abschnitt eignen sich für genauere Untersuchung Mischungen mit etwa 2% Bicarbonat, 1—10% Pepton *und* einigen Prozenten Zucker. Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit geschieht im Nitrometer nach *Lunge*, deren Meßröhre von einem weiteren Glasmantel umgeben wird.

Der Zwischenraum wird mit Wasser gefüllt, das auf 37° erhitzt wird. Die Heizung besorgt ein in das Wasser getauchter Kohlenstab, der von Wechselstrom durchflossen ist. Der Temperaturausgleich wird durch Luftrührung bewirkt. Über Quecksilber als Sperrflüssigkeit wird das Nitrometer mit 50 ccm der Gärlösung beschickt. Das entwickelte Kohlendioxyd wird an der Teilung des Nitrometers abgelesen, wobei das Niveaugefäß dauernd nachgerückt wird. Wenn erforderlich, wird das Kohlendioxyd durch Öffnen des Hahnes abgelassen.

Die Angaben der folgenden Tabelle V beziehen sich sämtlich auf Lösungen, die 2% Bicarbonat enthalten, außerdem die in der Tabelle angeführten Mengen Pepton *S.* und Traubenzucker. Bei der Herstellung der Lösungen wurde von der inzwischen gemachten Erfahrung Gebrauch gemacht, daß es unbeschadet der Gärkraft zulässig ist, die Peptonzuckerlösung vorgängig der Zugabe des Bicarbonats auf dem siedenden Wasserbad zu erhitzen, wodurch die Bakterienkeime zum größten Teile (aber mit Ausnahme der Sporen) getötet werden. Mäßig langes Erhitzen beeinträchtigt die Gärfähigkeit nicht nur nicht, sondern übt sogar einen befördernden Einfluß aus.

Die Lösungen werden demgemäß folgendermaßen hergestellt: Zucker und Pepton werden in der Reibschale zusammengerieben, hierauf wird ein Drittel der Wassermenge langsam unter Rühren zugegeben. Nach völliger Lösung wird 20 Minuten auf dem siedenden Wasserbad sterilisiert, dann rasch filtriert und die restlichen $^2/_3$ Volumen Wasser, worin vorgängig das Bicarbonat gelöst wurde, zugefügt, umgeschüttelt, und die Lösung in das Nitrometer eingefüllt.

Die Reproduzierbarkeit der Lösungen mit 1% Pepton ist sehr gut, diejenige der mit 5 und 10% Pepton nicht so vollkommen, indem sowohl die Inkubationszeit, als der Endpunkt der Gärungen individuellen Schwankungen unterworfen sind, für die wahrscheinlich kleine Unterschiede der Handhabung bei der Bereitung der Lösungen verantwortlich sind. Die Art der Breibereitung scheint auf die Dispersität des Peptons auch noch nach dem Erhitzen auf dem Wasserbad von Einfluß zu sein. Je nachdem tritt raschere oder langsamere Flockung ein und damit ein früherer oder späterer Stillstand der Gärung. Wenn die Flockung

Tabelle V.
Die Zahlenwerte bedeuten ccm CO_2.

Zeit Std.	10 proz. Pepton *Siegfr.*		5 proz. Pepton *Siegfried*			Zeit Std.	1 proz. Pepton *Siegfr.*	
	8 proz. Z.	1 proz. Z.	8 proz. Z.	1 proz. Z.	1 proz. Z.		8 proz. Z.	1 proz. Z.
½	0	0	—	—	—	15½	0	0
1	12,5	4	—	—	—	16	2	1
1½	25	10	—	—	—	16½	10	5
2	37	19	—	—	—	17	17	11
2½	55	28	—	0	—	17½	27,5	21
3	68	37,5	—	1,5	—	18	35	25
3½	75	45	0	6	—	18½	—	—
4	83	51	1,5	10	—	19	—	—
4½	—	57	6,0	12	—	19½	54,5	52
5	100	71	9,5	15,5	—	20	—	—
5½	—	—	—	—	—	20½	—	—
6	—	—	—	—	0	21	—	—
6½	—	—	25	35	2	21½	81,5	75
7	134,5	99	35	44	5	22	—	—
7½	—	—	44	50	—	22½	94	88
8	—	110	—	—	12,5	23	—	—
8½	—	115,5	—	—	14,5	23½	107	101
9	165	115,5	65	75,5	21	24	—	—
9½	175	—	—	—	26	24½	—	—
10	185	—	—	—	31	25	124	115
10½	194	—	87,5	98	40,5	25½	—	—
11	204	—	—	—	48,5	26	128	115
11½	—	—	101	110	56	26½	—	—
12	215	—	—	112,5	64,5	27	—	—
12½	223	—	110	—	76	27½	—	—
13	227	—	—	112,5	88	28	—	—
13½	—	—	118	—	—	28½	—	—
14	235	—	—	—	104	29	—	—
14½	—	—	125	—	108	29½	—	—
15	240	—	125	—	—	30	128	—
15½	244	—	—	—	112			
16	244	—	—	—	112			
18	244	—	125	—	112			
Nummerierung d. Kurven	I	II	III	IV	V		VI	VII

sofort oder schon nach 10 Minuten eintritt, so wird kein Zucker vergoren.

Die Zahlenwerte der Tabelle V sind auf der Kurventafel, Abb. 2 graphisch veranschaulicht. Namentlich die Kurven mit 5% Pepton zeigen deutlich den autokatalytischen Charakter. Der Abbruch der Gärung bei ca. 115 ccm CO_2 in den Lösungen mit 1% Zucker erfolgt fast plötzlich und zwar, wie die Rechnung lehrt, wegen völligen Verbrauchs des Zuckers. Mit den Daten: Litergewicht des Kohlendioxyds bei 37° und 720 mm: 1,65 g, Löslichkeit bei 37° und 720 mm: 0,1 g in 100 g Wasser, liefert die Rechnung 115 ccm CO_2 = 0,44 g Milchsäure. Zucker vorhanden: 0,50 g. — Zu den Versuchen mit 3% Zucker haben

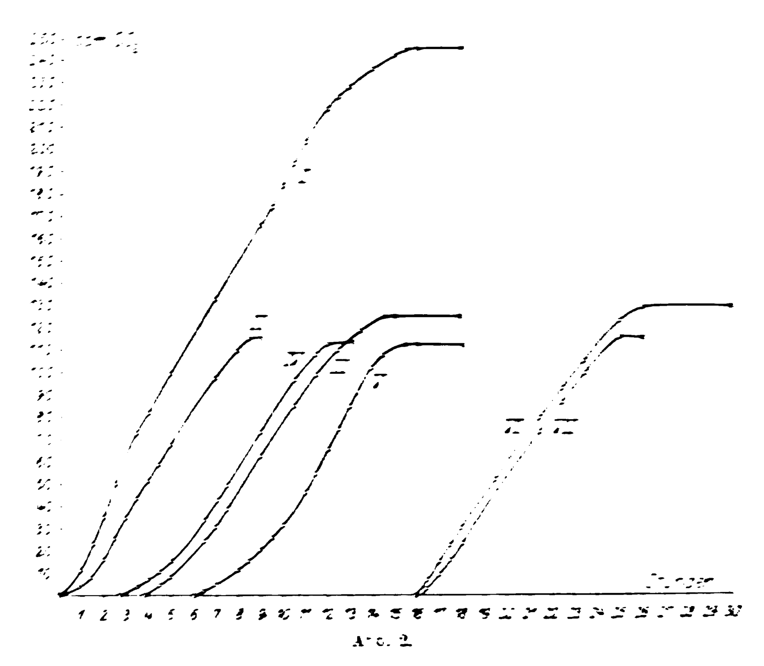


Abb. 2

wir Stillstand der Gärung nach Vergärung von ungefähr $^1/_3$ bzw. $^2/_3$ der vorhandenen Menge.

Man sieht also, daß der Stillstand der Gärung bei Überschuß des Zuckers von der Flockung des Peptons, bei Unterschuß des Zuckers aber von dessen Verbrauch beherrscht wird.

Die Kurven bestätigen den früheren Befund, daß Zunahme der Peptonkonzentration die Inkubationszeit abkürzt und die Dauer der Gärung verlängert.

Analytische Untersuchung und Umsatz-Bilanz.

Um für die analytische Bestimmung der Produkte der Gärung genügende Stoffmengen zu bekommen, wurde die Gärung mit je 750 ccm Lösung vorgenommen, die in einer Kochflasche im Thermostaten bei 37° sich befanden, während das entwickelte Kohlendioxyd in einer Kugelburette über gesättigter Kochsalzlösung als Sperrflüssigkeit aufgefangen wurde.

Nach vollzogener Gärung ist in der Lösung der übrige Zucker, die Milchsäure und die jodoformgebende Substanz (Alkohol) zu bestimmen. Vorgängig ist die Milchsäure zu identifizieren. Zu diesen Bestimmungen dienten die folgenden Methoden:

a) *Identifizierung der Milchsäure.*

Die vergorene Lösung wird angesäuert, der Peptonniederschlag zentrifugiert, alsdann die Lösung ausgeäthert und die ätherische Lösung verdampft. Es ver-

bleibt ein Sirup, der in der Porzellanschale auf dem Wasserbad vollständig von flüchtigen Bestandteilen befreit wird. Darübergehaltenes Lackmuspapier färbt sich nicht rot; es sind also keine flüchtigen Fettsäuren vorhanden. Der Rückstand muß eine Oxysäure sein. Derselbe gibt folgende Reaktionen:

1. Blaue Eisenphenolatlösung färbt sich mit einigen Tropfen des Rückstandes gelb, also eine Oxysäure ist vorhanden.

2. 0,2 ccm des Rückstandes werden mit 2 ccm konz. H_2SO_4 2 Minuten im Wasserbad erhitzt, erkalten gelassen, mit 1—2 Tropfen einer 5proz. weingeistigen Kodeinlösung versetzt; eine stark braune Färbung zeigt Milchsäure an.

3. Einige Tropfen werden mit 5 ccm konz. H_2SO_4 und einem Tropfen konz. $CuSO_4$-Lösung erhitzt (im Wasserbad); nach dem Abkühlen werden 2—3 Tropfen ca. $^1/_2$ proz. weingeistiger Thiophenlösung zugegeben und erwärmt. Es tritt eine tief kirschrote Färbung auf. Milchsäure ist anwesend.

4. 1 ccm des Rückstandes wird mit kaltgesättigter alkoholischer Zinkacetatlösung versetzt. Nach einigen Stunden haben sich kleine feine Nadeln von Zinklactat gebildet. Die Milchsäure ist damit qualitativ sicher nachgewiesen.

5. Die Lösung des Ätherabdampfrückstandes in Wasser hat kein optisches Drehungsvermögen. Die entstandene Milchsäure ist also die gewöhnliche, optisch inaktive Gärungsmilchsäure.

6. Mikroskopische Prüfung des Zinklactates. Mehrere Gramme der im Gärversuch aus Zucker dargestellten Milchsäure werden wie unter 4. in das Zinksalz verwandelt; dasselbe wird abgesaugt und aus Wasser umkrystallisiert. Hierbei erhält man feine Nadeln, die unter dem Mikroskop meßbar sind. Ein Vergleichspräparat wird hergestellt aus käuflichem Natriumlactat durch Ansäuern seiner wässerigen Lösung, Ausäthern usf. wie oben, schließlich Umkrystallisieren des Zinnlactates aus Wasser. Beide Krystallisationen erweisen sich unter dem Mikroskop als identisch. Die Krystalle sind Prismen mit gerader Auslöschung. Der Winkel zwischen Prisma und Doma beträgt 118°, derjenige der beiden Domenflächen 124°.

7. Analyse des Zinklactates. Das Zinksalz der Gärungsmilchsäure ist von *Buff*[1]) analysiert worden. Es hat die Formel $(CH_3CHOHCOO)_2Zn \cdot 3\,H_2O$. Danach enthält es 18,1% H_2O und 21,9% Zn. Mein aus dem Gärversuch gewonnenes Zinklactat ergab bei der Analyse: 0,0608 g Zinklactat aus dem Exsiccator wiegen nach 24 Stunden Luftbad bei 100°: 0,0501 g, entspricht 17,7% H_2O.

1,2801 g Zinklactat werden als Zinksulfid gefällt und als Zinkoxyd gewogen. Erhalten 0,4220 g ZnO = 21,5% Zn.

b) *Jodoformprobe.*

Von der angesäuerten und durch Zentrifugieren geklärten Gärlösung wird die Hälfte (etwa 300 ccm) abdestilliert. Das Destillat wird mit viel Pottasche versetzt und auf 60° erhitzt unter Eintragen von Jod, bis es nicht mehr entfärbt wird. Geruch nach Jodoform und Abscheidung der bekannten gelben Krystallflitter beweisen die Anwesenheit eines jodoformgebenden Stoffes. In sämtlichen Versuchen betrug die Abscheidung nur wenige Milligramm. Die Konzentration des mutmaßlich vorhandenen Alkohols ist sonach zu gering, um ihn durch seine Reaktion mit p-Nitrobenzoylchlorid identifizieren zu können.

c) *Bestimmung des Zuckers.*

Nach der Gärung wird qualitativ mit *Nylanders* Reagens (2 g Wismutnitrat und 10,4 g Seignettesalz in 100 ccm 8proz. Natronlauge) auf Zucker geprüft. In denjenigen der unten tabellierten Versuche, in denen in der Spalte für Glucose

[1]) Liebigs Ann. d. Chem. **140**, 159. 1866.

eine Null steht, verlief die Prüfung (schwarzer Niederschlag nach dem Aufkochen) negativ.

Zur quantitativen Bestimmung des unvergorenen Zuckers kann die Polarisierung nicht verwendet werden wegen der Anwesenheit linksdrehender Aminosäuren. Daher wurde der Zucker in der zentrifugierten Gärlösung nach *Fehling* in der üblichen Weise titriert. Bekanntlich wird die *Fehling*sche Lösung so eingestellt, daß zur Entfärbung von 10 ccm der Kupfersulfatlösung 0,1 g Zucker gebraucht wird. Werden also z. B. von der vergorenen Lösung 11,75 ccm gebraucht, so sind in 750 ccm enthalten:

$$\frac{750 \cdot 0{,}1}{11{,}75} = 6{,}29 \text{ g Glucose.}$$

Nach diesem Verfahren sind die in der unten folgenden Tabelle VI eingetragenen Zuckerwerte bestimmt.

d) Bestimmung der Milchsäure.

Wegen des ungünstigen Teilungsverhältnisses der Milchsäure [etwa 1 : 12 nach *Pinnow*[1])] ist ein erschöpfendes Ausäthern aussichtslos. Die Milchsäure wurde daher bei allen Gärungsanalysen, bei denen keine oder nur sehr kleine Mengen Zucker unvergoren blieben, nach dem Verfahren von *Möslinger*, verbessert von *Baragiola* und *Schuppli*[2]), folgendermaßen durchgeführt:

25 ccm der vergorenen und zentrifugierten (vorher mit verdünnter Salzsäure angesäuerten) Lösung, die höchstens 3‰ Milchsäure enthalten darf (aus der Kohlendioxydentwicklung kann dies berechnet werden), wird mit 25 ccm Wasser und 5 ccm einer 10proz. Bariumchloridlösung versetzt und mit heißgesättigter Bariumhydroxydlösung neutralisiert; nach dem Eindampfen auf ca. 15 ccm, wobei die Lösung genau neutral gehalten werden muß, bringt man sie in einen Mischzylinder und läßt erkalten. Man spült mit 96proz. Alkohol nach und füllt damit unter stetem Umrühren auf 100 ccm auf. Man filtriert durch ein mit Uhrglas bedecktes Faltenfilter (Dauer 3 Stunden). Vom Filtrat werden 75 ccm in einem Kölbchen mit 25 ccm 5proz. Natriumsulfatlösung versetzt, umgeschüttelt, etwa $^1/_4$ Stunde absetzen gelassen und das Bariumsulfat durch ein Faltenfilter abfiltriert Vom Filtrat werden 75 ccm in einer Platinschale eingedampft, verkohlt und die Asche weißgebrannt (Dauer ca. 2 Stunden). Nach dem Abkühlen wird mit genau eingestellter $^n/_5$-Salzsäure aufgenommen, wobei das aus Bariumlactat entstandene Bariumcarbonat gelöst wird; hierauf wird filtriert und mit $^n/_5$-Kalilauge zurücktitriert mit Methylorange als Indicator. Daraus läßt sich die Milchsäure leicht berechnen. Aus 7,5 g Zucker wurden 7,2 g Milchsäure gefunden (bei Versuch Nr. 2). Damit ist die quantitative Milchsäuregärung bestätigt. Die Milchsäurebestimmungen nach *Möslinger* können, wenn nicht genau nach Vorschrift verfahren wird, zu große oder zu kleine Werte liefern. Von einer Gärlösung müssen mehrere Milchsäurebestimmungen gemacht werden. Wenn diese miteinander und mit dem aus der Kohlendioxydentwicklung berechneten Wert übereinstimmen, so kann die Bestimmung als richtig angesehen werden.

In den Versuchen 7 und 8 der Tabelle VI ist die Milchsäurebestimmung unterblieben wegen der großen Menge Pepton (10%). Man kann aber indirekt aus der gemessenen Kohlendioxydmenge auf die gebildete Milchsäure zurückschließen, indem für das Litergewicht des Kohlendioxyds bei 15° und 720 mm: 1,75 g, und für die Löslichkeit bei 37° und 720 mm: 0,1 g in 100 g Wasser angesetzt wird. Der so berechnete Wert für die Milchsäure ist etwas zu klein, teils wegen Über-

[1]) *J. Pinnow*, Zeitschr. f. analyt. Chemie **54**, 321. 1915.

[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **27**, 842. 1914.

sättigung der Gärlösung an Kohlendioxyd, teils wegen Verlust durch Absorption über der Sperrflüssigkeit.

Die Tabelle VI enthält 10 nach den obigen Methoden vollständig durchgeführte Versuche.

Tabelle VI.

Versuchs-nummer	750 ccm Lösung enthalten: vor der Gärung: Bic. g	Glucose g	Pepton S. g	nach der Gärung: Glucose g	Milchsäure g	Jodoform mg	Menge CO_2 in Litern bei 15 gemessen	Beginn der CO_2-Entwicklung nach Stunden	Dauer der Gärung in Stunden
1	7,5	7,5	7,5	0	6,9	2—3	1,4	16	6
2	7,5	7,5	7,5	0	7,2	2—3	1,4	16	6
3	7,5	15,0	7,5	6,4	8,1	2—3	1,6	15	6
4	7,5	15,0	7,5	6,3	8,1	2—3	1,6	15	6
5	7,5	7,5	37,5	0	6,9	2—3	1,5	8	8
6	15,0	15,0	37,5	6,2	8,2	2—3	1,6	8	8
7	15,0	15,0	75,0	0	11,2	12	2,7	sofort	12
8	15,0	22,5	75,0	7,0	11,2	12	2,7	sofort	14
9	7,5	0	7,5	0	0	0	0	—	—
10	15,0	0	75,0	0	0	0	0,2	sofort	3

Die Versuche 9 und 10 sind zuckerfreie Kontrollen. Im 7. und 8. Versuch steht unter „Milchsäure" ein „berechneter" Wert, der nach der Kohlendioxyderzeugung geschätzt ist. Statt 11,2 g sollte der Wert etwa 15 g sein. Der Grund für das Zurückbleiben dieser Zahl ist schon angegeben. Legt man aber das gemessene Kohlendioxydvolumen vom 1. und 2. Versuch zugrunde und rechnet damit die dort gefundene Milchsäuremenge proportional um, so würde man ungefähr zu der richtigen Zahl kommen.

In den Versuchen 1 bis 6 ist die Summe der nach der Gärung bestimmten Mengen von Glucose plus Milchsäure nahe gleich der vor der Gärung vorhandenen Glucose. Hiermit ist bewiesen, daß die Gärung dargestellt wird durch die Gleichung: $C_6H_{12}O_6 = 2\ C_3H_6O_3$.

In den Versuchen von *Baur* und *Herzfeld* betrug die Milchsäuregärung (nach der Kohlendioxyderzeugung beurteilt) etwa 95% des gesamten Umsatzes; der Rest war wahrscheinlich alkoholische Gärung. In den vorliegenden Versuchen kommt auf diese Nebenreaktion nur etwa $^1/_{0000}$ des Umsatzes.

Das Verhalten des Peptons.

Die analytische Untersuchung, die im vorigen Abschnitt behandelt wurde, wäre unvollständig, wenn die Veränderungen, die am Pepton vor sich gehen, außer acht gelassen würden. Wie schon beschrieben, tritt während der Gärung eine äußerlich erkennbare Veränderung ein. Die zuerst fast klar durchsichtige Gärlösung wird milchig trübe und gleichzeitig setzen sich langsam gröbere Flocken ab. Gegen den Schluß der Gärung ist starke Flockung vorhanden; die überstehende Lösung wird wieder klar und die Gasentwicklung hört auf. Flockungsvorgänge dieser

Art unterliegen einem autokatalytischen Verlauf[1]). Es scheint, daß die Milchsäuregärung gerade dieser Flockung parallel geht und daher ein entsprechendes Zeitgesetz befolgt. Nur während der Dispersitätsänderung bekommen wir den Zuckerzerfall als *induzierte* Reaktion. Dieser Umstand ist schon von *Baur* und *Herzfeld* betont worden. Die Autoren deuten auch an, daß die Dispersität nicht die einzige Änderung ist, die am Pepton vor sich geht, sondern daß gleichzeitig ein hydrolytischer Vorgang stattfindet.

Die *Hydrolyse oder Autolyse des Peptons* habe ich quantitativ untersucht und gefunden, daß der Gehalt an freien Aminosäuren während der Gärung und *nur* während derselben eine *starke Zunahme* erfährt.

Für die Dosierung freier Aminosäuregruppen steht uns in der Reaktion mit Ninhydrin (Triketohydrindenhydrat) ein ausgezeichnetes Hilfsmittel zu Gebote. Es ist von *E. Herzfeld*[2]) gezeigt worden, daß jede freie Aminosäuregruppe, einerlei zu welcher einfachen oder verketteten Aminosäure sie gehört, gleichviel zu der Erzeugung des blauen Farbstoffes beiträgt, der mit Ninhydrin entsteht und dessen Menge colorimetrisch leicht gemessen werden kann. Hierbei dient eine Vergleichslösung, die mit einer bekannten Menge, z. B. von Glykokoll, bereitet wurde, als Standard. Die so durch colorimetrischen Vergleich erhaltenen Werte kann man entweder in Grammen Glykokoll oder in Grammen Stickstoff ausdrücken. In der unten folgenden Tabelle VII ist der letztere Ausdruck gewählt. Die Bestimmung wird nach *E. Herzfeld* folgendermaßen ausgeführt:

1 ccm der zu untersuchenden Lösung wird mit ca. 10 ccm Alkohol versetzt, das alkoholische Filtrat in einer Porzellanschale unter Zugabe von 0,5 ccm einer 1 proz. Lösung von Triketohydrindenhydrat eingedampft, nachdem die Lösung durch Zutropfen von verdünnter Natronlauge genau gegen Lackmus neutralisiert worden ist. Dann sofort aufgenommen mit 90 proz. Alkohol in mehreren Portionen, wobei sich eine tiefblaue oder violette Lösung bildet. Die Lösung wird colorimetriert mit einer Vergleichslösung, die aus 1 ccm einer 1 promill. Glykokollösung hergestellt wird. Es werden jeweilen 3 Parallelbestimmungen nebeneinander aus-

Tabelle VII.

Versuchs-nummer	Zusammensetzung der Gärlösung 750 ccm enthalten:			Ninhydrintiter von 750 ccm Lösung in g Stickstoff	
	Bie. g	Zucker g	Pepton S. g	vor der Gärung	nach der Gärung
1	7.5	7,5	7,5	0,135	0,34
2	7.5	7.5	7,5	0,135	0,37
3	7,5	15,0	7,5	0,140	0,41.
4	7,5	15,0	7,5	0.135	0,41
5	7,5	7,5	37,5	0,67	1,12
6	15,0	15,0	37,5	0,67	1,12
7	15,0	15,0	75,0	1,36	2,24
8	15.0	22,5	75.0	1,36	2,40
9	7,5	0	7.5	0.135	0.12
10	15,0	0	75,0	1,36	1,00

[1]) *Freundlich* und *N. Ishizaka*, Kolloid-Zeitschr. **12**, 230. **1913.**
[2]) *E. Herzfeld*, diese Zeitschr. **59**, 249. 1914.

geführt. Bei Anwesenheit von sehr viel Aminosäuren soll die zu untersuchende Lösung zuerst auf das 10fache Volumen verdünnt und davon 1 ccm zur Bestimmung verwendet werden.

In den Versuchen 1—10 der Tabelle VI sind die Ninhydrinwerte ermittelt worden. Dieselben stehen in der Tabelle VII verzeichnet.

Der Aminotiter (ausgedrückt in Grammen Stickstoff auf 750 ccm) wird vor der Gärung, d. h. unmittelbar nach der Bereitung der Lösungen, und nach der Gärung, d. h. im allgemeinen nach 24 Stunden, bestimmt. Wir erhalten das belangreiche Ergebnis, daß der Aminotiter während der Gärung sich verdoppelt oder verdreifacht. Im Blindversuch dagegen bemerkt man keine solche Zunahme, sondern sogar eine kleine Abnahme, was auf einen Reversionsvorgang hinweist. Es wird weiter unten gezeigt, daß der während der Gärung einsetzende autolytische Prozeß nicht so sehr darin besteht, daß niedere Aminosäuren abgespalten werden, sondern darin, daß sich höhere Polypeptide in niedere Peptide aufspalten. Dieser Vorgang scheint mit der Gärung in einer notwendigen Weise verflochten oder gekoppelt zu sein. Diese Feststellung gewährt einen tieferen Einblick in das Wesen der vorliegenden Gärung. Wie schon *Baur* und *Herzfeld* darlegten, muß sich daraus eine neue Auffassung fermentativer Prozesse entwickeln, nämlich deren Einreihung unter die induzierten Reaktionen.

Die Rolle des Bicarbonats.

Zusatz von Natriumbicarbonat ist eine unerläßliche Bedingung, um die Milchsäuregärung in Gang zu bringen. Es läßt sich feststellen, daß das Salz als Puffer wirkt zur Aufrechterhaltung einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration. Denn es kann durch geeignete andere, die Neutralität regelnde Salze ersetzt werden. Die gewöhnlich hierzu verwendeten Phosphatgemische sind zwar untauglich, da sie zu rasche Flockung des Peptons hervorrufen. Wohl aber gelingt es, die Milchsäurebildung bei Zusatz von Natriumacetat einzuleiten, einen Puffer von sehr schwacher Alkalität, der seiner einwertigen Ionen wegen nicht stärker flockend wirkt als Bicarbonat.

Folgende Lösungen wurden im Nitrometer bei 37° beobachtet:

I. 0,75 g Natriumacetat + 0,75 g Traubenzucker + 0,75 g Pepton Siegfried + 75 ccm Wasser.

II. 1,5 g Natriumacetat + 0,75 g Traubenzucker + 0,75 g Pepton Siegfried + 75 ccm Wasser.

In beiden Lösungen tritt keine Gasentwicklung ein. I. bleibt während einigen Tagen klar und reagiert dann noch schwach alkalisch. II. trübt sich nach einigen Stunden zunehmend. Tags darauf wird gesättigte Natriumbicarbonatlösung zugegeben. Sofort entwickeln sich etwa 40 ccm Kohlendioxyd, zum Zeichen, daß eine entsprechende Säurebildung stattgefunden hat.

Es ist also möglich, das Bicarbonat durch Acetat zu ersetzen, wenn man die richtigen Mengenverhältnisse einhält. Die Rolle des Bicarbonates als Puffer scheint hiermit befriedigend aufgeklärt zu sein.

Die Eigenart der Peptone.

Es ist in einem früheren Abschnitt die Wirksamkeit des Pepton Witte mit der des Pepton Siegfried verglichen und festgestellt worden, daß das zweite dem ersten weit überlegen ist. In der Tat bekommt man mit

Lösungen, die 1% Bicarbonat, 1% Zucker und 1% Pepton Witte enthalten, erst nach mehreren Tagen eine Gasentwicklung, die mit einer gewissen Unsicherheit behaftet ist, weil inzwischen faulige Zersetzungen eingetreten sein können.

Man mußte fragen, womit dieser Unterschied im Verhalten der beiden Peptone zusammenhängt. Hier war zunächst daran zu denken, daß der Grad des Eiweißabbaus von Einfluß sein könnte. Das Pepton Siegfried ist stärker aufgespalten. Es enthält keine Albumosen, d. h. es bleibt die Reaktion mit Sulfosalicylsäure aus, wogegen das Pepton Witte damit einen Niederschlag erzeugt. Ich habe nun versucht, das Pepton Witte in das andere Pepton zu verwandeln, indem die wässerige Lösung des Wittepeptons 2–3 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt wurde. Es treten dabei Hydrolysen ein, wie daraus klar erkannt werden kann, daß die Peptonlösung nach der Erhitzung einen um etwa 30% höheren Ninhydrinwert besitzt. Eine so behandelte Pepton Witte-Lösung hat nun in der Tat eine verbesserte Gärwirkung. Die Inkubationszeit in dem obigen 1 proz. Gärgemisch findet sich herabgesetzt von etwa 6 Tagen auf 35 Stunden. Immerhin ist sie noch doppelt so lange wie beim Pepton Siegfried, auch ist die Gasentwicklung bedeutend langsamer.

Es muß also noch einen anderen Unterschied zwischen den beiden Peptonen geben. Ich habe nun zunächst eine Anzahl anderer Peptone auf ihre Gärkraft untersucht, wobei sich herausstellte, daß es zwei Kategorien gibt, eine „unwirksame" und eine „wirksame".

Unwirksam sind:

Pepton Witte, Pepton Roche, Pepton Merck sine sale.

Wirksam sind:

Pepton Siegfried, Pepton Merck e carne, Pepton Merck ex albumine.

Die erste Kategorie verhält sich übereinstimmend so, wie für Pepton Witte schon angegeben (also keine Gärung in 24 Stunden in der 1 proz. Mischung: sofortige, aber nur ca. 4 Stunden andauernde Gärung mit 10% Pepton). Die zweite Kategorie verhält sich wie Pepton Siegfried, aber mit quantitativer Abstufung, indem dieses noch in 1/2 proz. Lösung wirksam ist, während für die beiden anderen 1 proz. Lösungen zum gleichen Effekt benötigt werden.

Die Aufklärung brachte die quantitative Analyse der Peptone. Es werden folgende Bestimmungen vorgenommen:

a) *Bestimmung des Aschengehaltes durch Veraschung.*

b) *Bestimmung der Phosphorsäure* (P_2O_5) *in der Asche.*

Der Phosphorsäuregehalt des Peptons wird nach *C. Neuberg*[1]) ermittelt.

5 g Pepton Witte werden in einer Platinschale verascht, angesäuert, filtriert und genau neutralisiert. 5 ccm einer Lösung, die 30 g Eisessig und 100 g Natriumacetat in einem Liter enthält, werden zugegeben. Nach dem Erwärmen wird

[1]) *C. Neuberg*, Der Harn usw. Bd. 1, S. 144. 1911.

vorsichtig aus einer Pipette Uranylnitratlösung zulaufen gelassen. Man tüpfelt auf mit Ferrocyankalium befeuchtetem Filtrierpapier, bis eine bleibende Braunfärbung auftritt. Dies zeigt das Ende der Titration an; die Lösung ist dabei grün geworden. Wenn die Uranlösung 35,461 g Uranylnitrat in einem Liter enthält, so zeigt 1 ccm dieser Lösung 5 mg P_2O_5 an.

c) *Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl.*

d) *Bestimmung des Stickstoffs im Phosphorwolframsäurenniederschlag.* In demselben befinden sich die Polypeptide und ein Teil der Aminosäuren, während die aliphatischen Monoaminosäuren gelöst bleiben. Die Phosphorwolframatlösung wird bereitet, indem man 60 g Natriumwolframat und 100 g Natriumphosphat in 500 ccm Wasser löst. 10 ccm einer 10 proz. Peptonlösung werden mit 20 ccm verdünnter Schwefelsäure versetzt und mit folgender Lösung bei 30° gefällt: 9 ccm Wasser werden mit 3 ccm konz. Schwefelsäure und 38 ccm Phosphorwolframatlösung vermischt und damit die Peptonlösung gefällt, wobei sofort ein weißer Niederschlag entsteht, der 2 Tage stehengelassen werden muß[1]). Nach dem Abnutschen und Trocknen wird der Niederschlag kjeldahlisiert.

e) *Bestimmung des Aminosäurestickstoffes* im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag mit Ninhydrin.

f) Bestimmung der offenen nicht verketteten Aminosäuregruppen mit Ninhydrin (*Ninhydrintiter*) in der ursprünglichen Peptonlösung und in der Peptonlösung nach der Gärung.

g) *Bestimmung des Stickstoffgehaltes in der Flockung nach der Gärung.*

Tabelle VIII enthält die vollständigen Angaben für fünf Peptone.

Tabelle VIII.

Die Zahlenwerte bedeuten Gewichtsprozente.

	Pepton Witte	Pepton sine sale Merck	Pepton Siegfried		Pepton e carne Merck	Pepton ex albumine Merck
			vor der Gärung	nach der Gärung		
Asche	2,50	1,3	5,79	5,79	5,19	6,51
P_2O_5	0,07	Spuren	1,75	1,75	0,63	0,46
Gesamtstickstoff	11,8	12,8	10,9	10,9	10,2	9,6
Stickstoff i. d. Flockung	—	—	—	0,48	—	—
Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlag	10,7	11,2	9,7	9,4	8,5	8,3
Aminostickstoff i. Filtrat	0,36	0,30	0,39	0,40	0,20	0,20
Gesamt-Aminostickstoff-(Ninhydrintiter)	1,4	2,6	1,5	4,4	2,3	1,7

Man sieht sofort, daß die einzelnen Peptone sich nicht allzusehr unterscheiden in bezug auf den Gesamtstickstoff und dessen Verteilung auf die verschiedenen Fraktionen, daß dagegen starke Unterschiede bestehen im Aschengehalt, namentlich aber in bezug auf Phosphorsäure. Die beiden „unwirksamen" Peptone (Witte und Merck sine sale) sind praktisch frei von Phosphorsäure, in den „wirksamen" Peptonen (Sieg-

[1]) *E. Baur* und *H. Barschall*, Arbeit. d. Kais. Gesundsheitsamtes Berlin **24**, 552. 1906.

fried, Merck e carne und Merck ex albumine) stuft sich die Wirksamkeit deutlich mit dem Phosphorsäuregehalt ab.

Dieser Befund ist sehr bedeutungsvoll; kennt man doch den maßgebenden Einfluß, den die Phosphate bei der Zymasegärung[1]) und im Stoffwechsel des Muskels[2]) entfalten.

Es war natürlich sofort zu prüfen, ob Zusatz von Dinatriumphosphat zum Pepton Witte dessen Gärkraft auf die Stufe der phosphorsäurehaltigen Peptone bringe. Angesetzt wurde die 1 proz. Gärmischung (1% Pepton Witte, 1% Zucker, 1% Bicarbonat) unter Zusatz von 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 und 1,0 g Dinatriumphosphat auf 50 ccm. In allen Fällen tritt aber zu rasche Flockung durch das Phosphorsäureion ein, wodurch Gärung verhindert wird. Es scheint, daß die Phosphorsäure im Pepton irgendwie organisch gebunden ist. Wie sich dies verhält, muß noch weiter untersucht werden.

Wirkung der Antiseptica und bakterielle Untersuchung.

Alles Vorangehende über die Milchsäuregärung der Glucose gilt unter der Voraussetzung, daß die untersuchte Reaktion keine Bakterienwirkung ist. Ob eine solche Einwirkung ausgeschlossen ist, mußte besonders untersucht werden. Hierbei genoß ich die schätzenswerte Hilfe des Assistenten am Hygienisch-bakteriologischen Institut der Eidg. Techn. Hochschule, Herrn *Acklin*, und die tätige Anteilnahme des Vorstandes des Institutes, Herrn Prof. Dr. W. v. *Gonzenbach*. Beiden Herren bin ich für ihre Unterstützung zu großem Danke verpflichtet.

Die Peptone sind von Haus aus *nicht steril*. Plattenversuche haben gezeigt, daß der Bakteriengehalt von Pepton Siegfried und Pepton Witte ungefähr gleich ist.

1 ccm einer 1 proz. Lösung enthält etwa 250 Bakterien. Nun kann man allerdings den größten Teil davon abtöten durch Erhitzen der Pepton-Zuckerlösung auf dem Wasserbad. Allein die Sporen widerstehen der Zerstörung. Auch dürfte es schwer sein, den Gärversuch vollkommen steril durchzuführen. Mindestens das Bicarbonat kann nicht mitsterilisiert werden. Unter diesen Umständen scheint es angezeigt, den Gärversuch mit Antisepticis durchzuführen. Die bei Fermentstudien meist gebrauchten Antiseptica sind Chloroform und Toluol. Es genügt zur Hintanhaltung jeder Bakterienentwicklung aber nicht, die Gärlösungen mit diesen Flüssigkeiten zu über- oder unterschichten. Vielmehr muß mit den Antisepticis kräftig durchgeschüttelt werden, um dieselben in feinen Tröpfchen in der Gärlösung zu verteilen. Eine solche Behandlung verträgt aber die Peptonlösung nicht. Mit Toluol geschüttelt, trübt sie sich sogleich stark und die Gärung unterbleibt. Noch schlimmer wirkt Chloroform und auch Quecksilberchlorid: Es entstehen sofort Flockungen, die erfahrungsgemäß die Gärfähigkeit aufheben, wo immer sie sich zeigen. Es muß einer späteren systematischen Durchforschung vorbehalten bleiben, zu entscheiden, ob sich Antiseptica finden lassen, die zwar alles Bakterienwachstum hintanhalten, sonst aber die Peptonlösung in ihrer Kolloidität so unbeeinflußt lassen, daß ihre Gärkraft unverändert bleibt.

[1]) *O. Meyerhof*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, 185. 1918.

[2]) *Embden-Laquer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 94. 1914.

Es gibt noch eine andere Art der Sterilisation, die sog. „fraktionierte Sterilisation“. Sie erfolgte durch Erhitzen im Dampftopf während einer halben Stunde, unter Wiederholungen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen, entsprechend der Behandlungsweise von leichtzersetzlichen, meist zuckerhaltigen Nährsubstraten in der bakteriologischen Technik. Die wiederholte Erhitzung auf 100° hat den Zweck, die inzwischen ausgekeimten Sporen zu vernichten. Die Sterilität wird so auch erreicht; gleichzeitig tritt aber auch eine sichtliche Veränderung der Peptonlösung auf, indem sich braune Flocken absetzen. Das Pepton hat alsdann seine zuckerspaltenden Eigenschaften eingebüßt.

Somit waren wir darauf angewiesen, den Beweis, daß Bakterien an dem Zustandekommen der Zuckerspaltung keinen irgendwie fühlbaren Anteil haben können, indirekt zu führen. Zunächst ließ sich durch Kulturen, die mit der vergorenen Peptonzuckerlösung angesetzt wurden, nachweisen, daß kein notorischer Milchsäurebildner anwesend war. Vorhanden ist nur der Bacillus subtilis. Daß dieser keine Säuerung in dem beobachteten Ausmaße hervorbringen kann, soll der folgende Versuch dartun:

Von der vergorenen Lösung wird ein wenig übergeimpft in eine Mischung von der Zusammensetzung: 0,1 g Bicarbonat, 0,1 g Pepton Witte, 0,5 g Zucker, in 10 ccm Wasser. Die Lösung trübt sich stark nach 24 Stunden, ein Zeichen, daß sich die Bakterien gut entwickeln. Indessen erscheint fast keine Gasentwicklung (0,3 ccm). Dagegen beginnt die Kohlensäureentwicklung nach 6 Tagen wie im ungeimpften Versuch.

Ein weiterer Versuch soll zeigen, daß, wenn auch die Wachstumsbedingungen für die Bakterien vollständig identisch sind, doch die Milchsäurebildung und Kohlensäureentwicklung ausbleiben können, wenn nur die Dispersitätsbedingungen der Peptonlösung abgeändert werden:

1,0 g Zucker und 1,0 g Pepton Siegfried werden in 20 ccm Wasser gelöst, 20 Minuten auf dem Wasserbad erhitzt und erkalten gelassen. Die Lösung wird in 2 Teile geteilt. Die erste Hälfte wird mit 40 ccm einer Lösung, die 0,5 g Bicarbonat enthält, schnell vermischt und im Nitrometer stehengelassen. Ein zweites Nitrometer wird zuerst mit 40 ccm derselben Bicarbonatlösung beschickt, hierauf die andere Hälfte der Peptonzuckerlösung vorsichtig darübergeschichtet. Es findet dann eine ganz allmähliche Vermischung der beiden Lösungen statt. Nach 20 Stunden ist bei der ersten Lösung eine starke Trübung aufgetreten, der dann die normale Gasentwicklung folgt; die zweite Gärlösung ist vollständig klar geblieben. Man kennt ja aus den Erfahrungen über die Elektrolytflockungen, daß die Art und Weise der Vermischung einer Salzlösung mit einer kolloiden Lösung auf deren Beständigkeit sehr von Einfluß sein kann. Obschon in beiden Versuchen zweifellos genau dieselbe Nährlösung und genau dieselben Bakterien vorhanden sind, ist der Effekt nur im ersten Versuch aufgetreten. Dies zeigt wiederum, wie außerordentlich empfindlich eine Fermentation auf den physikalisch-chemischen Zustand anspricht, und daß eine bakterielle Wirkung in unserem Falle so gut wie ausgeschlossen ist.

Das wichtigste Beweismittel gegen den Verdacht einer Bakterienwirkung ist aber die Gesamtheit der in den vorangehenden Abschnitten geschilderten quantitativen Abhängigkeiten. Insbesondere haben wir es

in der Hand, durch Änderung der Peptonkonzentration den Beginn der Gärung gesetzmäßig zu verschieben, und man kann es dahin bringen, daß die Gärung so gut wie sofort einsetzt, bevor an ein irgend ausreichendes Bakterienwachstum gedacht werden kann. Im Hinblick darauf können wir uns über etwa anwesende Bakterien vollständig beruhigen, wenn auch zugegeben werden muß, daß im Interesse der Reinheit des Versuches weitere Anstrengungen, die Bakterien vollständig wegzubringen, angezeigt erscheinen.

Einige weitere Beobachtungen.

1. Der Temperatureinfluß.

Ohne demselben eine ausführliche Untersuchung zu widmen, ist festgestellt worden, daß bei 45° die Milchsäuregärung bereits zu versagen beginnt. Bei 30° zeigt sich die Gärung verzögert. In der 1 proz. Mischung (1% Pepton Siegfried, 1% Zucker, 1% Bicarbonat) nahm die Gärung bei 30° folgenden Verlauf:

Zeit	Stunden	24½	25	27	30	44
CO_2 aus 50 ccm Lösung	ccm	0	0,5	51	54	105

2. Aminosäuren.

Um zu prüfen, ob vielleicht reine Aminosäuren zur Einleitung einer Milchsäuregärung hinreichend sein möchten, sind Lösungen der folgenden Zusammensetzung angesetzt worden:

0,1 g Bicarbonat + 0,1 g Zucker + 0,1 g Aminosäuren + 10 ccm Wasser. Als Aminosäuren kamen der Reihe nach zur Anwendung: Glykokoll, Asparaginsäure, Leucin.

Diese Mischungen erwiesen sich indessen als unwirksam. Hieran änderte es auch nichts, wenn anstatt reinem Wasser eine Nährlösung verwendet wurde, hergestellt aus[1]): 1,5 g NaCl, 0,03 g $CaCl_2$, 0,1 g $MgSO_4$, 0,7 g Na_2HPO_4 in 250 ccm Wasser (der entstehende flockige Niederschlag ist abzufiltrieren). Die Unwirksamkeit solcher Zusammensetzungen ist übrigens ein weiterer Beweis dafür, daß in den Peptonversuchen der Effekt nicht auf Bakterienwachstum zurückzuführen ist.

Die Unwirksamkeit reiner löslicher Aminosäuren zeigt, daß die höheren Peptide mitwirken. Die Anwesenheit von Kolloidteilchen ist zweifellos eine Grundbedingung. Vielleicht könnte es gelingen, die Peptone durch passende Mischungen definierter Polypeptide zu ersetzen. Allerdings wäre wegen der Unzahl von Kombinationen ein Erfolg vielleicht nur durch einen glücklichen Griff zu erreichen.

3. Schutzkolloide.

Der Gedanke liegt nahe, durch Schutzkolloide den Effekt sicherer und besser zu gestalten. Versuche mit zentrifugierten Tragantlösungen von verschiedener Konzentration, mit Agar-Agar, Gummiarabicum, Kirschgummi, Dextrin usw. zeigten, daß der Gäreffekt in keinem Falle

[1]) *König*, Handb. d. Nahrungsmittelchemie, 4. Aufl., Bd. 3, I. Teil, S. 643. 1910.

verbessert wird. Die Gasentwicklung wird entweder ganz verhindert oder verzögert, nie aber vermehrt. Immerhin wäre es nicht ausgeschlossen, daß sich kolloide Stoffe finden lassen, die in geeigneter Konzentration den Effekt zu verstärken vermöchten.

4. Putride Gärung.

Die zuckerfreien Kontrollversuche, sowie solche mit Pepton Witte, die sehr lange beobachtet werden müssen, gehen manchmal in Fäulnis über, was sich durch Geruch nach Methylamin verrät. Es war daher geboten, durch eine schärfere Prüfung bei den richtig verlaufenen Milchsäuregärungen sich von der Abwesenheit solcher fremder, von Bakterien ausgehenden Veränderungen zu überzeugen. Pepton Siegfried, wie fast alle Peptone, enthalten Tryptophan, nachzuweisen durch die Rot- und Violettfärbung mit *Rohdes*[1]) Reagens, das aus 20 g Dimethylaminobenzaldehyd, 500 ccm konz. HCl und 500 ccm Wasser zusammengesetzt ist. Tryptophan verwandelt sich bei jeder Spur von Fäulnis in Indol, welches durch folgendes Reagens eine Rotfärbung zeigt: 20 g Dimethylaminobenzaldehyd in 500 ccm Wasser. Die richtig vergorene Lösung, damit versetzt, bleibt farblos, während mit *Rohdes* Reagens das unveränderte Tryptophan nachweisbar ist. Putride Gärungen bei den richtig verlaufenen Versuchen sind somit ausgeschlossen. Tritt einmal Geruch nach Methylamin auf, so ist auch Indol nachweisbar. Solche Versuche müssen verworfen werden.

Zusammenfassung.

Die von *Emil Baur* und *E. Herzfeld* als „Gärung ohne Hefe" beschriebene Zersetzung der Glucose unter Bildung einer Säure und eines jodoformgebenden Stoffes ist weiter untersucht worden. Es wird festgestellt, daß Glucose in Lösungen, die Bicarbonat als Puffer enthalten, durch Pepton bei 37° quantitativ in Milchsäure übergeführt wird. Die Gärung erreicht nach bestimmter Zeit ihr Ende durch einen Flockungsvorgang am Pepton. Das Pepton kann sein eigenes Gewicht an Zucker vergären. Der zeitliche Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer wird festgestellt. Die Gärung kommt um so rascher in Gang, je mehr Pepton anwesend ist. Die Konzentration des Zuckers übt nur einen geringen Einfluß aus. Eine wichtige Rolle spielt die Gegenwart von Phosphat, indem phosphatfreie Peptone zur Erregung einer Glucose-Milchsäuregärung unvermögend sind. Unbeschadet der Gärkraft kann die Peptonzuckerlösung vor Zusatz des Puffers auf dem Wasserbad erhitzt werden. Während der Gärung und *nur* während dieser nimmt die Zahl der freien Aminosäuregruppen im Pepton zu. Milchsäurebildende Bakterien sind in der gärenden Lösung nicht nachweisbar.

[1]) *Rohde*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 161. 1905.

Über die Peptongärung.

Von

Emil Baur und **Eugen Herzfeld.**

(Aus dem Physikalisch-Chemischen Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule und dem Chemischen Laboratorium der Medizinischen Klinik der Universität Zürich.)

(Eingegangen am 21. April 1922.)

Die vorangehende Arbeit von *G. Schlatter* über die Milchsäuregärung der Glucose durch Pepton ist geeignet, in mehrfacher Hinsicht zu Erörterungen allgemeiner Art anzuregen. Ohne uns in diese zu verbreiten, möchten wir nur auf den *einen* Punkt hinweisen, wieso nämlich die von uns behandelten Peptongärungen Licht auf die Fragen werfen können, die bei der Untersuchung der glykolytischen Wirkung von Tier und Pflanzensäften aufgetaucht und umstritten sind.

Nach *E. Buchners* Entdeckung der zellfreien Gärung des Hefepreßsaftes sind zahlreiche Versuche mit zellfreien Preßsäften tierischer und pflanzlicher Gewebe angestellt worden. Es sollte festgestellt werden, ob solche Säfte glykolytische Eigenschaften besitzen, indem sie Zucker abbauen, sei es zu Milchsäure oder zu Kohlensäure und Alkohol. Das eine wie das andere ist wiederholt durch den Versuch erwiesen worden, doch scheinen sämtliche einschlägigen Arbeiten unter mangelhafter Reproduzierbarkeit zu leiden. Außerdem werfen sich die Autoren wechselseitig unvollkommene Ausschließung von Bakterienwirkung vor.

Die umfangreichsten, analytisch eingehendsten, trotzdem jedoch am meisten beanstandeten Untersuchungen über das glykolytische Vermögen von Tier- und Pflanzenorgansäften rühren von *J. Stoklasa*[1]) her. In weiter Verbreitung findet er sowohl alkoholische als auch Milchsäuregärung; die Effekte fielen aber sehr verschieden aus, je nach der Herstellung des Preßsaftes. Ungefähr gleichzeitig beobachtete *O. Cohnheim*[2]) Glykolyse an Fleischpreßsäften teils für sich, teils nur unter gleichzeitigem Zusatz eines Extraktes aus Pankreas und unter Zusatz von Natriumbicarbonat. Er bekommt in 15 Stunden mit 30 ccm Fleischsaft einen Umsatz von 0,15 g Glucose. Effekte von ähnlichem Ausmaß werden von *F. Blumenthal*[3]) und *Feinschmidt*[4]) an Pankreas- und Leberpreßsäften beobachtet, wobei

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **101**, 311. 1904. — Zeitschr. f. physiol. Chem. **50**, 301. 1906.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 336. 1903; **42**, 401. 1904; **43**, 547. 1905.

[3]) Dtsch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 51.

[4]) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**, 511. 1903.

indessen der eine vergeblich auf Milchsäure, der andere vergeblich auf Alkohol prüfte. Daß Blut glykolytische Eigenschaften besitzt, ist schon seit *Cl. Bernard* bekannt. Es ist auch festgestellt, daß der Abbau primär zur Milchsäure erfolgt[1]). Immerhin sind die Effekte stark wechselnd, nach *P. A. Levene* und *G. M. Meyer*[2]) ist die Anwesenheit von Phosphat und Bicarbonat eine notwendige Voraussetzung. Die Gegenwart unversehrter Blutzellen scheint dagegen nicht notwendig, nachdem *R. von Schroeders*[3]) und *N. Sieber*[4]) mit getrocknetem, pulverisiertem Blutfibrin und auch mit einem, nach mehrtägiger Digestion gewonnenen, wässerigen Extrakt aus Fibrin reichliche Glykolyse bekommen haben.

Es scheint uns, daß die Erfahrungen, die wir mit der Glykolyse durch Pepton machten, manches Fragwürdige an der Glykolyse durch Organpreßsäfte aufklären können.

Der unterschiedliche Erfolg in bezug auf das glykolytische Vermögen der Säfte erinnert sehr an die Unterschiede, die wir im Verhalten verschieden zusammengesetzter Peptone antreffen. Der leicht eintretenden Unwirksamkeit der Säfte entspricht eine Unwirksamkeit der Peptone im Falle, daß dieselben zu rasch ausflocken. Die Erschöpfung der Gärkraft der Säfte findet ihr Seitenstück in dem Stillstand der Peptongärung nach eingetretener Flockung. Ist gelegentlich darauf Rücksicht genommen worden, die Gärkraft der Säfte durch Natriumbicarbonat zu stabilisieren, so lehrt uns erst das Studium der Peptongärung, eine wie notwendige Bedingung diese Stabilisierung ist. Auf dem Wege der Analyse erweisen unsere Peptongärungen die Wichtigkeit der Mitwirkung von Phosphorsäure, von der bekannt ist, daß sie in Form ihres Hexoseesters nach *Embden-Laquer*[5]) die Entstehung von Milchsäure im Muskelpreßsaft begünstigt und teils in dieser Form, teils als Natriumsalz für die alkoholische Gärung das Hefepreßsaftes von einer maßgebenden Bedeutung ist[6]).

Daß die alkoholische Gärung neben der Milchsäuregärung je nach Fall entweder ganz zurücktritt oder aber merklich wird, haben auch wir erfahren. Wenn die glykolytische Wirkung in sehr weiter, man möchte sagen, allgemeiner Verbreitung bei Organsäften vorkommt, so kann dies nicht mehr wundernehmen, seit wir durch die Peptongärung davon unterrichtet sind, daß es die gewöhnlichen, in allen Organsäften vorkommenden, Eiweißaubbauprodukte sind, mit denen die Gärwirkung verknüpft ist.

Unseren Versuchen am nächsten stehen offenbar die aus dem Laboratorium von *F. Blumenthal* stammenden und von *N. Sieber* und *R. von Schroeders* mit-

[1]) *A. Slosse*, Arch. internat. de physiol. **9**, 154. 1911.

[2]) Journ. of biol. chem. **11**, 361; **12**, 265. 1902.

[3]) Über die Wirkung des aus Fibrin erhaltenen glykolytischen Fermentes auf verschiedene Zuckerarten. Diss. Berlin 1904.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 484; **44**, 560. 1905.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**, 181. 1917.

[6]) *H. Euler* und *S. Heintze*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, 252. 1918. — *O. Meyerhof*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, 185. 1918.

geteilten Versuche mit Fibrinaufschwemmungen. Findet *J. Stoklasa*, daß ein unter 200 Atm. Druck hergestellter Preßsaft nicht wirkt, wohl aber ein mit 300 Atm. hergestellter, oder findet *O. Cohnheim*, daß gewisse Muskelsäfte schon für sich, andere erst nach Zusatz von Pankreasextrakt wirken, so muß man sich gegenwärtig halten, daß solche Säfte, ebenso wie Hefepreßsaft, aus einem kolloiden und einem ultrafiltrierbaren Anteil bestehen, und daß beide Fraktionen vorhanden sein und im richtigen Verhältnis stehen müssen, um die beste Wirkung zu gewährleisten. Auch die Peptongärung zeigt deutlich die Notwendigkeit des Zusammenwirkens seiner höher und niedriger dispersen Teile.

Zwei Einzelheiten der Organsaftglykolyse waren bisher besonders bedenklich und schienen auf Bakterienwirkung zu deuten: daß häufig eine längere Inkubationszeit verstreicht, bis die Gärung in Gang kommt, und daß die in der Fermentforschung gebräuchlichsten Antiseptica: Toluol, Chloroform und Quecksilberchlorid, wenn sie genügend ausgiebig verwendet werden, die Gärung gewöhnlich ganz hemmen. Beides finden wir auch bei der Peptongärung, können uns aber überzeugen, daß die Inkubationszeit in gesetzmäßiger Weise von der Zusammensetzung abhängt und wahrscheinlich von dem autokatalytischen Verlauf eines Flockungsvorganges beherrscht wird, und daß die obigen Antiseptica deswegen stören, weil sie eben diese Flockung in augenfälliger Weise beeinflussen. Wir haben also bei der Peptongärung Grund, dieses Verhalten aus den chemischen Bedingungen des Systems zu verstehen, und brauchen ihretwegen einen Verdacht auf Bakterienwirkung noch keinen Raum zu geben. Die Übertragung dieser Beweisführung auf die Organsaftglykolyse ist gegeben. *C. Oppenheimer* in seinem Werke „Die Fermente und ihre Wirkungen“[1]) bemüht sich in anzuerkennender Weise, den bezweifelten Ergebnissen der Arbeiten über Glykolyse gerecht zu werden, und kommt zum Schluß, daß das Eingreifen fremder Kräfte, also der Bakterien, unerwiesen sei. Wir glauben, daß unsere Erfahrungen an der Peptongärung dieses Urteil nur bekräftigen können. Wenn nun *C. Oppenheimer*[2]) einen Fortschritt auf diesem Gebiet durch „Isolierung“ des maßgeblichen Fermentes erwartet, so meinen wir, daß die Frage jetzt ein anderes Gesicht angenommen hat. Der Organsaft besteht nicht aus einem Principium fermentationis, das aus dem Saft, wie der Duft aus der Rose, herauszuziehen, und einem toten Ballast, der als Verunreinigung abzuscheiden wäre, sondern der Saft ist in globo das Ferment. Man darf ihm nichts entziehen wollen, namentlich nicht seine Trübe. Dies ist der Grund, warum das glykolytische Ferment „mit dem Protoplasma enger verklammert“ erscheint. Für Protoplasma brauchen wir bloß Kolloidteilchen zu setzen, dann haben wir es bei seinem richtigen Namen genannt.

---

[1]) 4. Aufl., Leipzig 1913, S. 740.
[2]) a. a. O. S. 735.

Wir wollen diese Betrachtungen nicht weiter ausspinnen, sondern nur noch hinzufügen, daß wir von den Beanstandungen von *A. Bau*[1]) gegen unsere erste Mitteilung (Gärung ohne Hefe) Kenntnis genommen haben. Wir glauben, daß die Arbeit von *G. Schlatter* den größeren Teil derselben aufklärt und hoffen, daß die Fortsetzung unserer Untersuchungen auch die letzten Bedenken wird zerstreuen können.

Nachtrag bei der Korrektur.

Wir haben inzwischen Kenntnis genommen von dem neuen Buch von *A. Fodor:* „Das Fermentproblem"[2]) und wollen nicht unterlassen, Nachdruck darauf zu legen, daß die Ansichten über die chemische Natur der Fermente, zu denen *Fodor* gelangt ist, mit den von uns gehegten weitgehend übereinstimmen. *Fodor* schreibt[3]): „Auch stellen sie (die Endofermente) nicht protoplasmafremde, etwa für das Protoplasma eingebettete (sekundäre) Bestandteile vor, sondern *die uns vertrauten protoplasmatischen Stoffe selber*, doch behalten sie ihre Aktivität nur solange, wie sie ihren *natürlichen Zustand* — vollständig oder partiell — bewahren."

Wie wir schon in unserer ersten Mitteilung („Gärung ohne Hefe") auseinandersetzten, erscheint nun der alte Streit zwischen *Liebig* und *Pasteur* in einem neuem Licht. Der Erste behält Recht, wenn er sagt, daß das Ferment grundsätzlich in Zersetzung oder Entwertung begriffen ist. Zum mindesten verändert es seine Kolloidität. Der Zweite behält Recht, wenn er sagt, daß die Fermentation ein Lebensprozeß ist. Sache des Lebens ist nämlich die *Wiederherstellung* des verbrauchten und vernutzten Fermentes.

---

[1]) Diese Zeitschr. **122**, 303. 1921.
[2]) *Steinkopff*, Dresden 1922, S. 280.
[3]) a. a O. S. 267.

Über die Inaktivierung von Saccharase durch Jod.

Von

H. v. Euler und Sture Landergren.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Eingegangen am 21. April 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Gegen molekularen Sauerstoff sind Saccharaselösungen bekanntlich wenig empfindlich; man kann Lösungen bei gewöhnlicher Temperatur in halbgefüllten Flaschen monatelang stehen lassen, ohne daß die Aktivität wesentlich abnimmt, sofern nur direkte Bestrahlung ausgeschlossen wird. Bei der Bestrahlung durch Sonnenlicht wie auch durch ultraviolettes Licht wird eine Inaktivierung der Saccharase hervorgerufen, sofern Sauerstoff zugegen ist; in Abwesenheit von Sauerstoff bleibt die Inaktivierung gering[1]). Daraus ist früher geschlossen worden, daß eine photokatalytische Oxydation durch Wasserstoffsuperoxyd vorliegt[2]), indessen konnte *Svanberg*[3]) zeigen, daß Wasserstoffsuperoxyd recht träge auf Saccharase einwirkt, während Ozon rasch zerstört.

Um weitere Anhaltspunkte für die chemischen Eigenschaften der Saccharase zu gewinnen, haben wir vor einiger Zeit auch die Einwirkung von molekularem Jod untersucht, und teilen einige Versuche in aller Kürze mit.

Experimentelles.

Zur quantitativen Bestimmung der Inaktivierung haben wir das Jod in Jodkaliumlösung zugesetzt, und zwar war die Zusammensetzung der Lösung per Kubikzentimeter: 0,74 mg Jod und 1,5 mg Jodkalium.

Die Versuche wurden so ausgeführt, daß Saccharaselösung und Jodjodkaliumlösung in bestimmtem Verhältnis gemischt wurden. Die Mischung blieb bei 17° 60 Minuten lang stehen, worauf die Mischung in

[1]) *Jamada* und *Jodlbauer*, **8**, 62. 1908. — Siehe auch ***Fernbach***, Ann. de l'inst. Pasteur **3**, 483. 1889.

[2]) *Agulhon*, Ann. de l'inst. Pasteur **26**, 38. 1912. — Zu einem entgegengesetzten Resultat waren *Jodlbauer* und *v. Tappeiner* gekommen (Arch. f. klin. Med. **87**, 373. 1906).

[3]) *Svanberg*, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi **8**, Nr. 6. 1921.

die Zuckerlösung eingetragen wurde. Dieselbe enthielt 4,8 g Rohrzucker und 2% PO_4. Gesamtvolum der Lösung: 60 ccm.

Es kamen zwei verschiedene Enzymlösungen zur Anwendung, eine weniger reine für die erste Versuchsreihe (If = 3,68; Zeitwert: 12,5 Min.), und eine besser gereinigte (If = 54; Zeitwert: 0,86 Min.).

Durch besondere Versuche wurde festgestellt, daß Jodkalium in der angewandten Verdünnung (rund 0,01 n) nicht inaktiviert.

Resultate.

Wir geben für jedes der beiden Präparate je eine Versuchsreihe an.

Tabelle I.

5 ccm Saccharaselösung + 1 ccm Jodlösung. Aktivität der Saccharaselösung: $k \cdot 10^1 = 111{,}0$. If. = 3,68. Trockensubstanzgehalt per Kubikzentimeter: 2,9 mg; also in 5 ccm 14,5 mg Trockensubstanz.

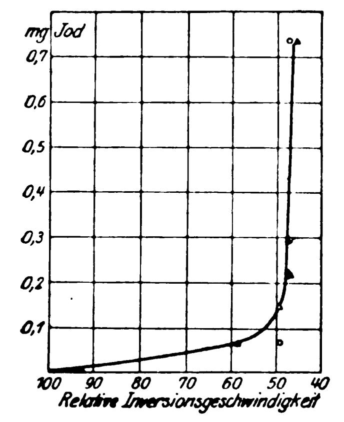
mg Jod	Minuten	Drehung in Graden	$k \cdot 10^4$	Mittel	Relative Inversionsgeschwindigkeit
0,07	10	2,09	(74)	65,1	58,7
	20	1,69	67,8		
	30	1,40	62,2		
	40	1,03	65,4		
0,15	10	2,22	55,4	55,1	49,6
	20	1,85	54,7		
	30	1,52	54,7		
	40	1,21	55,6		
0,22	10	2,22	55,0	52,2	47,0
	20	1,89	49,3		
	30	1,59	50,8		
	40	1,26	53,5		
0,30	10	2,23	54,0	53,1	47,8
	20	1,88	52,5		
	30	1,56	52,7		
0,74	10	2,33	51,0	51,0	45,9

Tabelle II.

1 ccm Saccharaselösung + 1 ccm Jodlösung. Aktivität der Saccharaselösung: $k \cdot 10^4 = 36$. If = 54. Trockensubstanzgehalt per Kubikzentimeter: 0,32 mg.

mg Jod	Minuten	Drehung in Graden	$k \cdot 10^4$	Mittel	Relative Inversionsgeschwindigkeit
0,07	60	1,84	18,6	17,7	49,2
	90	1,57	17,3		
	120	1,29	17,3		
0,05	60	1,89	17,2	17,9	49,8
	90	1,54	18,0		
	120	1,21	18,6		
0,74	60	1,90	17,0	16,8	46,7
	90	1,61	16,6		
—	120	1,07	(21,0)	—	—

In der Abbildung werden die Werte der relativen Inversionsgeschwindigkeit, welche in der Versuchsreihe 1 erhalten worden sind, durch Dreiecke, die Werte der Versuchsreihe 2 durch Kreise bezeichnet.



Um zu erfahren, ob es sich bei dieser Inaktivierung um eine reversible Wirkung (ev. Addition) von molekularem Jod auf das Saccharasemolekül handelt, oder um eine irreversible chemische Reaktion, haben wir versucht, die Aktivität der mit Jod behandelten Lösung durch Thiosulfat wiederherzustellen.

Vorversuch.

1 ccm 2% PO_4 enthaltende Saccharaselösung mit einer Konstanten $k \cdot 10^4 = 31$ und 1 ccm Jodlösung (0,74 mg J_2) wurden gemischt und standen 60 Minuten bei 17°. Die Mischung wurde in die Zuckerlösung (4,8 g Rohzucker) eingetragen; Gesamtvolumen 60 ccm. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde eine mit der vorhandenen Jodmenge äquivalente Menge Natriumthiosulfat zugesetzt und nach weiteren 30 Minuten wurde wieder die Inversionsgeschwindigkeit gemessen. Es ergab sich:

	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$
Ohne $Na_2S_2O_3$ . . .	30	2,28	15,8
Mit $Na_2S_2O_3$ . . .	30	1,88	15,8

Der Inaktivierungsgrad war in beiden Fällen gleich.

Hauptversuch.

1 ccm Saccharaselösung ($k \cdot 10^4 = 31$) + 1 ccm Jodlösung (0,74 mg J_2). Inkubationszeit 60 Minuten. Hierauf Zusatz der äquivalenten Menge $Na_2S_2O_3$; 60 Minuten Einwirkungsdauer.

Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$
0	2,65	—
30	2,28	16,0
60	1,97	15,4
90	1,69	15,2
∞	0,93	—

Die Inaktivierung betrug somit $100 \cdot 15,5 : 31 = 50\%$.

Eine Reaktivierung der mit Jod behandelten Lösung durch Thiosulfat trat also nicht ein.

Die Empfindlichkeit der Saccharase gegen Jod ist recht erheblich. Man entnimmt aus den angegebenen Zahlen, daß 0,32 mg Saccharasepräparat (vom angegebenen Zeitwert) durch rund 0,03 mg Jod um 25% geschwächt werden.

Eine ähnliche Empfindlichkeit gegen Jod zeigt nach den Versuchen, welche *Urban Olsson* im hiesigen Laboratorium angestellt hat, auch die Amylase.

Besonders wollen wir die Aufmerksamkeit auf die Form der Inaktivierungskurve, also auf die Beziehung zwischen Jodmenge und Inaktivierungsgrad lenken. Unsere Versuche führen nämlich zu dem auffallenden Resultat, daß von einem gewissen Vergiftungsgrad, angenähert von der halben Inaktivierung an, weitere Jodzusätze die Aktivität der Lösung nicht mehr ändern. Der zweite Teil des Inversionsvermögens der Saccharase bleibt also auch durch großen Überschuß von Jod (siehe die Abbildung) unangegriffen. Auffallend ist, daß an 2 Präparaten von so ungleichem Wirkungsgrad, wie die in Tab. I und II erwähnten und auch an einem neuerdings untersuchten, noch reineren Präparat (If = 95) durch die gleichen Jodmengen die gleichen Vergiftungsgrade erreicht werden. Über Versuche[1]), den eventuell jodierten oder oxydierten und den nicht jodierten Saccharasebestandteil zu isolieren und über Kontrollversuche bezüglich Vergiftung wird an anderer Stelle berichtet werden.

Die Vergiftungsgrenze ist analog mit derjenigen, welche vor kurzer Zeit *Euler* und *Myrbäck*[2]) bezüglich der Inaktivierung von sehr reinen Saccharaselösungen (Zeitwert 0,5 bis 1,0) durch Silbernitrat erhalten haben. Für die anläßlich dieser Ergebnisse vermutete Existenz von Saccharasen verschiedener Aktivität hat sich bisher kein weiterer Anhaltspunkt ergeben.

---

[1]) *Euler u. Josephson*, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, 1922.

[2]) Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, Nr. 36. 1922.

Über die asymmetrische Wirkung des Emulsins bei der Benzoxynitril-synthese.

Von

E. Nordefeldt.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(*Eingegangen am 24. April 1922.*)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Einleitung.

In einer früheren Arbeit habe ich gezeigt[1]), daß nicht unbedingt ein Enzym als die Ursache der *symmetrisch*-synthetischen Wirkung des Emulsins bei der Benzoxynitrilsynthese angesehen werden muß, wie es *Rosenthaler*[2]) angenommen hat, sondern daß diese als einfache Aciditätswirkung betrachtet werden kann. Die einzige übrigbleibende spezifische Wirkung, die das Emulsin auf eine Mischung von Benzaldehyd und Cyanwasserstoff ausübt, ist deshalb die Hervorrufung der *Asymmetrie* des entstehenden Oxynitrils.

In der hier vorliegenden Arbeit studierte ich hauptsächlich die Bedingungen für das Bildungsoptimum des aktiven d-Oxynitrils und einige Eigenschaften des Emulsins.

I. Über das d-Benzoxynitril.

1. Allgemeine Methodik.

Die Ausbildung der optischen Aktivität verfolgte ich durch zwei etwas verschiedene Methoden:

Methode I. Polarimetrische Untersuchung nach Ausschütteln mit Chloroform. In einer Reihe Fläschchen mit Stöpseln wurde aus einer Bürette ein bestimmtes Volumen einer Wasserlösung von Cyanwasserstoff bekannter Normalität mit einer abgewogenen Menge feingepulverten Emulsins (siehe S. 400) zusammengebracht. Nach eventueller Ver-

---

[1]) Diese Zeitschr. **118**, 15. 1921.

[2]) Diese Zeitschr. **14**, 238. 1908; **17**, 257. 1909; **19**, 186. 1909; **26**, 1 u. 7. 1909; **28**, 408. 1910; **50**, 486. 1913. — Arch. der Pharm. **246**, 365. 1908; **248**, 105 u. 534. 1910; **249**, 510. 1911; **251**, 56 u. 85. 1913.

dünnung mit Wasser wird einige Minuten geschüttelt und gewartet, wobei das Pulver quoll und in eine schleimige Fällung überging, die sich in der Flüssigkeit verteilte; dann wurde eine mit dem Cyanwasserstoff äquimolekulare Menge Benzaldehyd bekannten Volumens eingeführt. Die Mischung wurde sogleich geschüttelt, was mit kurzen Pausen gleichförmig für alle Proben der Versuchsreihe wiederholt wurde. Durch den reichlichen Emulsinschlamm hielt sich das Benzaldehyd einigermaßen gleichförmig in der Flüssigkeit verteilt, und das Ganze wurde bei höheren Wärmegraden mittels Thermostat bei konstanter Temperatur gehalten. Nach bestimmter Zeit wurde jede Flasche mit einem gewissen Volumen Chloroform ausgeschüttelt, welches dann mittels eines Scheidetrichters abgetrennt, durch Schütteln mit ein wenig wasserfreiem Natriumsulfat von Feuchtigkeit befreit und mit Na-Licht in einem 5 cm-Rohr polarisiert wurde. Durch polarimetrische Prüfung der zurückbleibenden Wasserlösung wurde kontrolliert, daß fast alle optisch aktive Substanz beim Ausschütteln ins Chloroform überging.

Bei einigen Reihen wurde zur gleichen Zeit der Gang der totalen Synthese beobachtet, indem vor dem Chloroformzusatz eine Probe (z. B. 3 ccm) mit Pipette herausgeholt und auf freien Cyanwasserstoff mit salpetersäurehaltigem Silbernitrat nach *Volhards* Methode titriert wurde.

Methode II. Direkte polarimetrische Untersuchung der homogenen Substratlösung. Eine bessere Methode wurde in der Weise gewonnen, daß als Lösungsmittel eine Mischung von Wasser und so viel *Alkohol* benutzt wurde, daß das Benzaldehyd und das Oxynitril die ganze Zeit hindurch gelöst erhalten blieben, wodurch die Ausbildung der optischen Aktivität in ein und derselben Lösung direkt verfolgt werden konnte. Zu diesem Zweck wurde der Cyanwasserstoff in konzentriertem Alkohol (96%) gelöst und mit einem zweckmäßigen Volumen filtrierter Wasserlösung von Emulsin (in einigen Fällen mit in Wasser aufgeschlämmtem Emulsinpulver) versetzt; hierauf wurde eventuell Acetatpuffer, in 47% Alkohol gelöst (spez. Gew. 0,924), und Benzaldehyd zugesetzt und die Mischung geschüttelt, wobei das Benzaldehyd in Lösung ging. Nachdem die immer unmittelbar entstehende Proteinfällung abfiltriert worden war, konnte die Lösung mit bestimmten Zeitintervallen direkt polarisiert werden. Bei Verwendung von Röhren von 1 oder 2 dm Länge war die Genauigkeit der Ablesung 0,05°.

Falls die eben erwähnte Fällung dann in eine neue Substratmischung eingeführt wurde, entstand darin keine merkbare optische Aktivität, weshalb sie nichts mehr vom Katalysator enthielt. Auch zeigte sich, daß die zum Abfiltrieren benötigte Zeit in der Ausbildung der optischen Aktivität keine Veränderung hervorrief. Deshalb wurde sie gewöhnlich unmittelbar vor der ersten polarimetrischen Ablesung abfiltriert.

Als Maß des Abnehmens der Drehung mit der Zeit (die *Inaktivierungsgeschwindigkeit*) wurde die Formel der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer monomolekularen Reaktion verwendet: $k' = \frac{1}{t} \log \frac{\alpha_0}{\alpha_t}$, wo t die Zeit in Stunden zwischen zwei polarimetrischen Ablesungen und α_0 und α_t die am Anfang und Ende des Intervalls beobachteten Drehungswinkel sind.

Als Maß der *Bildungsgeschwindigkeit des totalen Oxynitrils* verwendete ich die Konstante der Reaktionsgeschwindigkeit einer bimolekularen Reaktion:

$$k = \frac{x}{a\,t\,(a - x)}$$

(a die Anfangskonzentration des freien Cyanwasserstoffes und x die Konzentrationsänderung im Zeitintervall t Stunden).

2. Die optische Aktivität nimmt mit der Zeit ab, während die totale Menge des Oxynitrils konstant bleibt.

Um die Bildungsgeschwindigkeit des optisch aktiven und des totalen Oxynitrils zu vergleichen, wurde folgender orientierender Versuch gemacht.

Versuch 1: 0,1 g Emulsin + 10 ccm Wasser + 9 ccm HCN (1,1 N) + 1,05 g C_6H_5CHO. Methode I. Titriertes Volumen 5 ccm. $AgNO_3$ 0,05 N.

a) Temperatur 17°.

Stunden	Drehung in Graden	$AgNO_3$ ccm verbr.	HCN % geb.	$k \cdot 10^3$ berechnet
1	0,98	25,4	51,2	4,2
3	1,35	18,0	65,4	
70	1,00	15,6	70,1	

b) Temperatur 36°.

Stunden	Drehung in Graden	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	1,05			7,1
1/2	1,17	18,6	64,3	
1	1,13	16,5	68,3	
1 1/2	1,05	16,0	69,3	
6 1/2	0,80	15,9	69,5	

Die Bildungsgeschwindigkeit sowohl asymmetrischen wie totalen Oxynitrils steigt also mit der Temperatur. Ehe die totale Synthese ihr Maximum noch erreicht hat, fängt indessen die Asymmetrie an abzunehmen, und dies geschieht schneller bei höherer Temperatur, wodurch sich erklärt, daß dieselbe dann nicht so starke Entwicklung erreicht. Dies

deutet darauf hin, daß ein „inaktivierender“ (d. h. ein die Asymmetrie aufhebender) Faktor in die Reaktion eingreift, und der Einfluß dieses Faktors scheint mit der steigenden Temperatur gesteigert zu werden.

8. Die optische Aktivität nimmt schnell mit steigender Temperatur ab.

Um den Zusammenhang zwischen Inaktivierungsgeschwindigkeit und Temperatur näher zu untersuchen, wurde folgender Versuch gemacht.

Versuch 2: **0,1 g Emulsin + 14,4 g Wasser + 5,4 ccm HCN (1,83 N) + 1,05 g C_6H_5CHO. Methode I.** Titriertes Volumen 3 ccm. **$AgNO_3$ 0,05 N.**

a) Temperatur 0°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	0,10		25,5	15,0	
					2,3
3	0,67		16,4	45,2	
					1,3
7	0,87		13,4	55,3	

Mittel $k \cdot 10^3 = 1,8$.

b) Temperatur 10°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	0,21		22,7	24,2	
					3,5
3	1,03		13,0	56,6	
					1,6
7	1,14		10,2	65,9	

Mittel $k \cdot 10^3 = 2,5$.

c) Temperatur 20°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	0,33		20,5	31,6	
					7,1
1	0,78		15,0	49,9	
					3,7
2 1/2	1,04		11,7	60,9	
					1,8
4	1,11		10,6	64,6	
6	1,12		9,8	67,3	
8	1,15		9,4	68,8	
		3,9			
15	1,08		8,9	70,3	
		6,0			
22	0,98		9,0	70,0	

Mittel $k' \cdot 10^3 = 5$, $k \cdot 10^3 = 4,2$.

d) Temperatur 30°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	0,51		16,7	44,2	
					[21,7]
1/2	0,78		14,4	51,9	
					9,7
3/4	0,90		12,9	56,9	
					6,9
1 1/4	0,98		11,2	62,5	
					5,3
1 3/4	1,05		10,2	65,9	
2 1/4	1,09		9,8	67,3	
3	1,10		9,6	67,9	

Mittel $k \cdot 10^3 = 7{,}3$.

e) Temperatur 40°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	0,86		13,1	56,3	
					10,0
1/2	0,88		11,8	60,6	
					6,2
1	0,86		10,5	64,9	
		59,4			
2	0,75		9,4	68,8	
		48,4			
4	0,60		8,8	70,6	

Mittel $k' \cdot 10^3 = 54$, $k \cdot 10^3 = 8$.

f) Temperatur 50°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	0,69		13,1	56,3	
		130,4			13,5
1/2	0,64		11,4	61,9	
		265,6			10,0
3/4	0,55		10,4	65,2	
		160,6			
1 3/4	0,38		9,6	67,9	

Mittel $k' \cdot 10^3 = 185$, $k \cdot 10^3 = 12$.

g) Temperatur 60°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
1/12	0,47		13,8	54,1	
					19,6
1/6	0,55		12,8	57,3	
		1283			23,5
1/4	0,43		11,8	60,6	
		1245			15,8
1/2	0,21		10,2	65,9	
		954			
1	0,07		9,6	67,9	

Mittel $k' \cdot 10^3 = 1100$, $k \cdot 10^3 = 20$.

Für das *totale* Oxynitril sinkt also innerhalb jedes einzelnen Versuches die Synthesegeschwindigkeit, gemessen durch *k*, ziemlich schnell mit der Zeit, was sich daraus erklärt, daß das zurückbleibende Benzaldehyd von der Luft oxydiert wird und dadurch die Acidität der Lösung immer mehr steigert, wodurch die Synthese langsamer geht. Mit steigender Temperatur wird die Synthesegeschwindigkeit gesteigert, obschon die gewonnenen Zahlenwerte aus der eben erwähnten Ursache ziemlich approximativ sind. Von der Temperatur unabhängig steigt in allen Fällen *die Menge des totalen Oxynitrils zu ungefähr ein und demselben Endwert,* und dieses Maximum erleidet dann keine Veränderung mit der Zeit (Abb. 1).

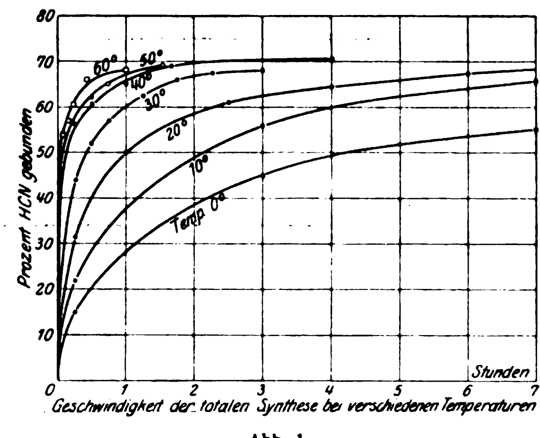


Abb. 1.

Ganz anders verhält sich die *optische Aktivität*. Bei niedriger Temperatur bildet sie sich zwar langsam aus, wie das totale Oxynitril, und bei höherer Temperatur schneller, aber das erreichte Maximum bleibt nicht stehen, sondern beginnt asymptotisch gegen Null zu sinken. Mit steigender Temperatur wird dieses Maximum immer niedriger und sein Hinabsinken immer schneller (Abb. 2). Augenscheinlich steigt die Stärke des inaktivierenden Faktors stark mit der Temperatur, so daß er immer vollständiger und schneller die optisch aktiven Oxynitrilmoleküle umwandelt, die während der Einwirkung des Emulsinkatalysators entstehen.

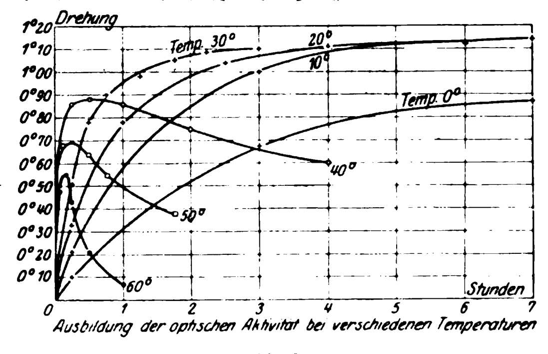


Abb. 2.

4. Die optische Aktivität nimmt rasch mit steigender Neutralität ab.

Versuch 3: Eine Reihe Mischungen wurden angestellt, jede 10 ccm Emulsinlösung + 5 ccm Acetatpuffer (1 N, in 47 proz. Alkohol gelöst) + 10,2 ccm HCN (1,93 N in 96 proz. Alkohol gelöst) + 2,09 g C_6H_5CHO enthaltend. Temp. 17°.

Nach 1 Stunde wurde die Proteinfällung abfiltriert, worauf die Lösungen mit bestimmten Zeitintervallen in einem 2 dm-Rohr polarimetrisch untersucht wurden.

a) $p_H = 3,3$.

Stunden	1½	3½	7	19	46
Drehung in Graden	2,10	2,20	2,45	2,50	2,50
$k' \cdot 10^3$	—	—	—	—	—

Mittel $k' \cdot 10^3 = 0$.

b) $p_H = 4,5$.

Stunden	1	1½	13½	19½
Drehung in Graden	4,40	4,60	4,40	4,30
$k' \cdot 10^3$	—	—	1,6	1,5

Mittel $k' \cdot 10^3 = 1,6$.

c) $p_H = 4,7$.

Stunden	1½	5	7	20	46
Drehung in Graden	4,55	4,65	4,60	4,30	3,85
$k' \cdot 10^3$	—	—	2,4	2,5	2,0

Mittel $k' \cdot 10^3 = 2,3$.

d) $p_H = 5,2$.

Stunden	1½	3½	6½	19	46
Drehung in Graden	4,40	4,25	3,95	3,20	2,10
$k' \cdot 10^3$	—	7,5	10,6	7,7	6,8

Mittel $k' \cdot 10^3 = 8,1$.

e) $p_H = 5,4$.

Stunden	1½	3½	6½	19
Drehung in Graden	4,25	4,00	3,70	2,70
$k' \cdot 10^3$	—	13,1	11,3	10,9

Mittel $k' \cdot 10^3 = 11,8$.

f) $p_H = 5,7$.

Stunden	1½	3½	6½	19
Drehung in Graden	3,40	3,00	2,60	1,25
$k' \cdot 10^3$	—	27,7	17,4	25,4

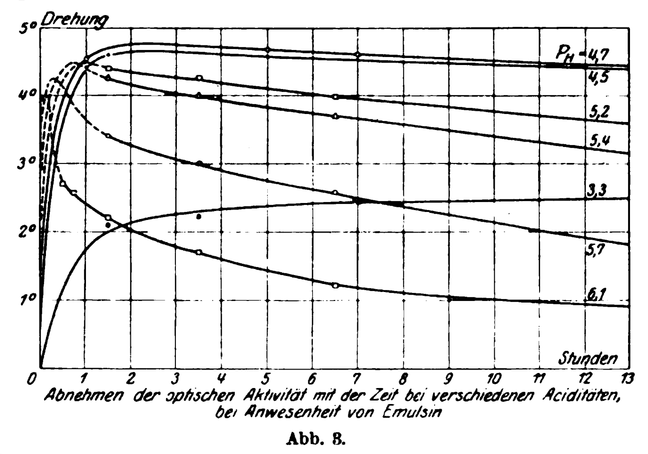
Mittel $k' \cdot 10^3 = 23,5$.

g) $p_H = 6,1$.

Stunden	½	¾	1½	3½	6½	19
Drehung in Graden	2,65	2,55	2,30	1,70	1,20	1,10
$k' \cdot 10^3$	—	66,8	60,0	66,6	63,0	60,0

Mittel $k' \cdot 10^3 = 63,3$.

Aus den hieraus angefertigten Kurven (Abb. 3) ergibt sich, wie in einigermaßen saurer Lösung die optische Aktivität sich ziemlich langsam ausbildet und ebenfalls äußerst langsam abnimmt. Je neutraler die Lösung wird, desto rascher bildet sich diese Aktivität aus und fängt



Abnehmen der optischen Aktivität mit der Zeit bei verschiedenen Aciditäten, bei Anwesenheit von Emulsin

Abb. 3.

dann bald an, immer rascher abzunehmen. In einer fast neutralen Lösung findet sie augenscheinlich kaum die Zeit, sich auszubilden, bevor sie wieder verschwunden ist.

Der Einfluß des inaktivierenden Faktors nimmt also mit steigendem p_H zu, um bei voller Neutralität augenblickliche und vollständige Symmetrie hervorzurufen.

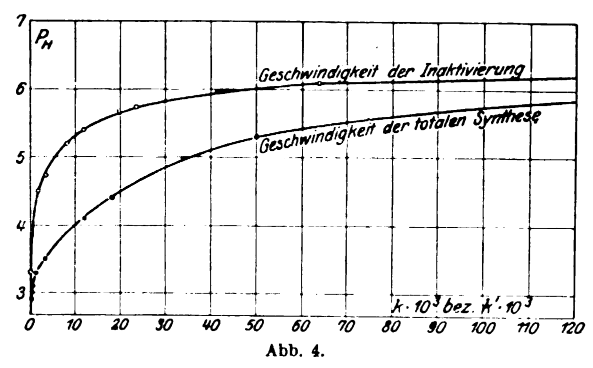


Abb. 4.

metrie hervorzurufen. Da bei verminderter Acidität, wo die Konzentration der H-Ionen abnimmt, die saure Dissoziation des Oxynitrils und also die Konzentration der Oxynitrilionen gesteigert wird, erscheint die Abnahme der optischen Aktivität gerade von dieser Dissoziation und den damit zusammenhängenden Umlagerungen verursacht.

Der Zusammenhang zwischen der *Inaktivierungsgeschwindigkeit* und der Acidität wird durch die obere Kurve in Abb. 4 veranschaulicht. Die

untere Kurve zeigt die Abhängigkeit der *totalen Synthesegeschwindigkeit* von der Acidität und ist meiner zitierten Arbeit entnommen. Obschon die Konzentrationen der reagierenden Stoffe bei beiden Kurven nicht völlig dieselben sind, kann durch einen Vergleich der Kurven eine gute Übereinstimmung mit den beobachteten Erscheinungen gewonnen werden.

Versuch 4: Um die Störungen in der Inaktivierungsgeschwindigkeit auszuschalten, die etwa durch die Anwesenheit des Emulsinpräparates hervorgerufen worden sind, wurde der Versuch 3 mit emulsinfreiem, optisch aktivem Oxynitril wiederholt.

1. *Herstellung des Oxynitrils.* 100 ccm Emulsinlösung + 88 ccm HCN (2,3 N, in 96proz. Alkohol gelöst) + 21,47 g C_6H_5CHO wurde bei Zimmertemperatur gemischt und nach $^1/_4$ Stunde filtriert, wobei die Drehung (2 dm-Rohr) 3,40° war, um nach noch $1^1/_4$ Stunden zu 3,90° zu steigen. Nachdem die optische Aktivität nach weiteren $1^1/_2$ Stunden, wie angenommen werden konnte, ihr angenähertes Maximum erreicht hatte, wurde die Mischung mit 60 ccm Chloroform ausgeschüttelt, wobei Wasser zugesetzt wurde, um die Löslichkeit des Oxynitrils in dem verdünnten Alkohol zu vermindern, wodurch fast alle optisch aktive Substanz vom Chloroform aufgenommen wurde. Das abgeschiedene oxynitrilhaltige Chloroform wurde mit ein wenig wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und auf dem Wasserbad bis 100° erwärmt, bis fast alles Chloroform verschwunden war, wonach das zurückbleibende ölähnliche Oxynitril in 47proz. Alkohol zum Volumen 100 ccm gelöst wurde. Die Drehung der Lösung (2 dm-Rohr) war 3,25°.

2. *Inaktivierung des Oxynitrils.* Zu je 20 ccm der letzterwähnten Lösung wurden 2 ccm Citratpuffer (2 N, in 47proz. Alkohol gelöst) gesetzt, wonach die Abnahme der optischen Aktivität bei verschiedenen p_H im 2 dm-Rohr verfolgt wurde.

a) $p_H = 3{,}6$.

Stunden	$^1/_4$	2	5	$6^1/_2$	21	46	120
Drehung in Graden	2,95	2,95	2,90	2,85	2,80	2,70	2,50
$k' \cdot 10^3$	—	—	—	—	0,5	0.6	0.5

Mittel $k' \cdot 10^3 = 0{,}5$.

b) $p_H = 4{,}8$.

Stunden	$^1/_4$	2	5	$7^1/_2$	21	46	120
Drehung in Graden	2,90	2,90	2,85	2,80	2,60	2,20	1,55
$k' \cdot 10^3$	—	—	2,5	3,0	2,4	2,9	2,0

Mittel $k' \cdot 10^3 = 2{,}6$.

c) $p_H = 6{,}8$.

Stunden	$^1/_{12}$	$^1/_4$	$1^1/_4$	$4^1/_2$	6	20
Drehung in Graden	2,60	2,30	1,20	0,25	0,10	0
$k' \cdot 10^3$	—	320	283	210	265	—

Mittel $k' \cdot 10^3 = 270$.

d) $p_H = 7$—8.

Die optische Aktivität verschwindet unmeßbar schnell. $k' \cdot 10^3$ = eine sehr große Zahl.

Auch diese Werte von $k' \cdot 10^3$ stimmen mit den in Versuch 3 gefundenen wohl überein. Die Anwesenheit des Emulsins scheint also auf die Geschwindigkeit, womit das Oxynitril inaktiviert wird, nicht merkbar störend einzuwirken, vorausgesetzt, daß die Acidität dabei keine Veränderung erleidet.

5. Die Ursache des Verschwindens der optischen Aktivität.

Aus den *Versuchen 1—4* hat sich ergeben, daß die Inaktivierung beschleunigt wird, teils durch das Erhitzen der saueren Lösung, teils durch Vermindern ihrer Acidität. Da die Temperatursteigerung die Geschwindigkeit der Hydrolyse steigert, könnte vermutet werden, ob eine Hydrolyse des Oxynitrils bei höherer Temperatur merkbar wird, wobei das Ammoniumsalz der Mandelsäure entstehen würde:

$$C_6H_5 \cdot CH \cdot OH \cdot CN + 2\,H_2O \rightleftarrows C_6H_5 \cdot CH \cdot OH \cdot COONH_4 .$$

Hierbei würde die Rechtsdrehung der Flüssigkeit immer mehr abnehmen, weil aus rechtsdrehendem Oxynitril, wie bekannt, linksdrehende Mandelsäure gebildet wird. Da aber der Zahlenwert der spezifischen Drehung bei dieser Mandelsäure [etwa —156°, *Lewkowitsch*[1])] um ein Vielfaches größer ist als beim Oxynitril [etwa +14°, *Feist*[2])], sollte zwar die Mischung nach einiger Zeit inaktiv, aber später immer stärker linksdrehend werden. Wie lange und wie rasch die Inaktivierung auch hat fortfahren können, so habe ich doch *niemals* gefunden, daß eine Linksdrehung eingetreten ist. Falls sich nicht zeigen sollte, daß auch die Mandelsäure in neutraler Lösung schnell racemisiert wird, spricht dieses gegen die Wahrscheinlichkeit einer Hydrolyse.

Versuch 5: Um, wenn möglich, vorläufig zu entscheiden, ob Mandelsäure gebildet wird, habe ich die Inaktivierung (bei Zimmertemperatur) in einer Lösung erfolgen lassen, die in einen Kolben eingeschlossen war und mit einer geringen Menge Kaliumcarbonat alkalisch gemacht war. Während 12 Stunden wurde durch diese Lösung ammoniakfreie Luft gesaugt, die dann eine Waschflasche mit 0,1 N. Schwefelsäure passierte. Hätte sich Ammoniummandelat gebildet, so hätte daraus vom Kaliumcarbonat Ammoniak frei gemacht werden sollen, das dann mit dem Luftstrom in die Schwefelsäure eingeführt worden wäre und also deren Titer vermindert hätte. Dieser wurde aber am Ende des Versuches unverändert gefunden. Hydrolyse konnte folglich nicht nachgewiesen werden.

Versuch 6: Endlich habe ich die Inaktivierung auch in einem Widerstandsgefäß mit zugehöriger Brücke und Mikrophon vor sich gehen lassen, damit eine bei dem Übergang des Oxynitrils in Mandelat entstehende Veränderung in dem Leitungsvermögen beobachtet werden konnte. Dieses blieb indessen die ganze Zeit unverändert.

Aus den *Versuchen 5—6* ergibt sich, daß die Inaktivierung wahrscheinlich nicht mit etwaigem Entstehen von Mandelsäure zusammenhängt. Obgleich die Möglichkeit anderer Umlagerungen nicht ganz ausgeschlossen ist, scheint mir doch vorläufig wahrscheinlich, daß hier

[1]) B. **16**, 1567. 1883.
[2]) Arch. d. Pharm. **247**, 226. 1909.

hauptsächlich nur eine *intramolekulare Umlagerung* vorliegt, nämlich Racemisierung in inaktives Oxynitril. Die Frage bedarf aber weiterer Bearbeitung.

II. Zur Kenntnis des Emulsins.

1. Die Herstellung des Emulsins.

In ihren Hauptzügen schloss sich meine Herstellung des hier verwendeten Emulsins an *Herisseys*[1]) Methode an[2]), wobei aber das Alkohol gegen *Aceton* vertauscht wurde, weil hierdurch teils die Fällung sich schneller absetzte, teils das Präparat dem Oxynitril kräftigere optische Aktivität zu erteilen schien. Die ganz neuerdings von *Willstätter* (l. c.) empfohlene Extraktion mit schwach ammoniakalischer Lösung entspricht durchaus meinen Erfahrungen.

Versuch 7: 0,1 g mit verschiedenen Fällungsmitteln hergestellter Mandelemulsinpräparate wirkten während 19 Stunden auf Mischungen von 4,4 ccm HCN (2,1 N, in Wasser gelöst) + 0,98 g C_6H_5CHO ein, wonach die optische Aktivität nach Methode I bestimmt wurde. *Resultat*: Mit Aceton gefälltem Emulsin 1,95°, alkoholgefälltem (neues) 1,45°, alkoholgefälltem (1/2 Jahr alt) 1,45°, acetongefälltem aber alkoholgewaschenem 1,57°.

Aceton scheint also ein zweckmäßigeres Fällungsmittel als Alkohol zu sein.

Auch aus Kernen von anderen *Prunus*-Arten, wie Kirschen und Pflaumen, habe ich kräftige Präparate erhalten, während dagegen die aus den Blättern der erwähnten Pflanzen gewonnenen Substanzen nur geringe Wirkung gezeigt haben. Ebenfalls hat ein Präparat aus Blättern von *Prunus serotina*, deren sich *Krieble*[3]) bedient hat, nur schwache optische Aktivität ergeben.

Versuch 8: 0,05 g Emulsinpräparat + 4,4 ccm HCN (2,1 N, in Wasser gelöst) + 0,98 g C_6H_5CHO. Temp. 30°. Methode I. Titriertes Volumen 2 ccm $AgNO_3$ 0,1 N.

Emulsinpräparat	Stdn.	Drehung in Graden	$AgNO_3$	HCN
Aus bitteren Mandeln (mit Aceton gefällt)	1/4	0,32	14,7	65,0
	1	0,75	10,9	74,0
	3	0,75	9,7	76,9
	5	0,50	8,8	79,0
Aus bitteren Mandeln (mit Alkohol gefällt)	1/4	0,22	—	—
	1	0,33	—	—
	2	0,38	10,9	74,0
	5	0,31	—	—
	5 1/2	0,30	8,0	80,9
Aus *Prunus serotina*-Blättern (mit Aceton gefällt)	1 1/4	0,06	14,2	66,2
	4	0,09	8,6	79,5
	19	0,08	8,4	80,0
	24	0,06	8,1	80,7

1) Recherches sur l'Emulsine. Thèse Paris, 1899, S. 44.

2) Diese Untersuchung war schon abgeschlossen, als die Arbeiten von *Helferich* (Zeitschr. f. physiol. Chem. **117**, 159. 1921) sowie von *Willstätter* und *Csányi* (Zeitschr. f. physiol. Chemie **117**, 172. 1921) erschienen, welche wertvolle Beiträge zur Darstellungsmethode des Emulsins bringen. Die genannten Arbeiten behandeln aber fast ausschließlich *Glucosidasen*.

3) Journ. of the Americ. chem. soc. **35**, 1643. 1913.

Aus dem Versuch ergibt sich, daß das aus Mandeln mit Aceton gefällte Emulsin eine etwa zweimal größere Menge optisch aktiven Oxynitrils gibt als das mit Alkohol gefällte, und beide ergeben eine bedeutend kräftigere Wirkung als das aus Blättern von *Prunus serotina* gewonnene Präparat. Dagegen scheint ihre verschiedene Herkunft und Herstellung auf die Geschwindigkeit der *totalen* Synthese nicht einzuwirken, welche, wie früher erwähnt, durch die Acidität der Lösung bestimmt wird.

2. Die Eigenschaften meiner Emulsinpräparate.

1. Ihre optische Aktivität. Eine neubereitete Wasserlösung von Mandelemulsin läßt sich bis zur Klarheit filtrieren und kann polarimetrisch untersucht werden, wobei dieselbe linksdrehend erscheint, einer spezifischen Drehung des Präparats von —47,7° entsprechend. Nach etwa 24 Stunden beginnt diese Lösung sich zu trüben und allmählich entsteht Fällung, durch das Entstehen freier Säure verursacht, die einen Teil der gelösten Eiweißstoffe ausfällt. In einer Lösung sank z. B. während 3 Tagen p_H von 6,51 auf 6,04. Beim Erhitzen der Lösung entsteht allmählich ein reichliches Koagulum und die Drehung verschwindet immer mehr.

Versuch 9: Eine Emulsinlösung von 4,09% Trockensubstanz (0,32% Asche) ergab im 2 dm-Rohr die Drehung —3,90°. Eine andere Lösung von 3,46% Trockensubstanz ergab die Drehung —3,30°, beide $[\alpha]^D = -47,7°$ entsprechend.

2. *Temperaturstabilität.* Um eine Auffassung von der Stabilität des im Präparat befindlichen Katalysators der Oxynitrilspaltung bei höherer Temperatur zu gewinnen, wurde folgender Versuch gemacht.

Versuch 10: Einige Fläschchen wurden mit je 10 ccm einer Emulsinlösung (4,09% Trockensubstanz, $p_H = 5,9$) beschickt und blieben während einer Stunde bei konstanter Temperatur, wonach sie rasch bis Zimmertemperatur abgekühlt wurden. Jetzt wurde zu den mehr oder weniger koagulierten Lösungen als Puffer 10 ccm Acetat (1 N, in 47 proz. Alkohol gelöst) von $p_H = 5,0$ und unmittelbar danach 15 ccm HCN (1,34 N, in 96 proz. Alkohol gelöst) und 2,13 g C_6H_5CHO zugesetzt. Nach einer Stunde bei 18° wurden die Fällungen abfiltriert, und dann wurden die Lösungen im 2 dm-Rohr untersucht. Resultat:

Temperatur	40°		50°		60°			70°		73°		76°		78°		80°	
Stunden	2	6	2	25	2	3	25	2	6	2	6	2	6	2	6	2	25
Drehung in Graden .	3,00	3,00	2,95	2,35	2,65	2,85	2,00	2,30	2,40	1,75	1,75	0,45	0,45	0,25	0,25	0	0

Zwischen 70° und 80° wird also die hier wirksame Substanz schnell inaktiviert, um nach einer Stunde Erhitzen bis 80° mit Bezug auf ihr Vermögen optisch aktives Oxynitril zu bilden, ganz inaktiv zu werden. Dies gilt wenigstens für p_H = ca. 5,9, obgleich es möglich ist, daß in noch neutraler, salzhaltiger oder schwach alkalischer Lösung, wo die Koagulierung nicht so leicht stattfindet, die Aktivität auch nach stärkerem Erhitzen weiter bestehen kann.

3. *Dialyse.* In bezug auf die bei einigen Enzymen nachgewiesene Existenz spezifischer, durch Dialyse abtrennbarer *Aktivatoren* (Koenzyme) schien es von Interesse zu sein, das Verhalten einer Emulsinlösung hierbei zu untersuchen. Im Zusammenhang hiermit wurde eine *Aschenanalyse* gemacht.

Versuch 11: Die Dialysen gingen bei Anwesenheit von Toluol in einer Anzahl Collodiumschläuchen vor sich, je etwa 15 ccm fassend, 3 Tage lang, mit oft wiederholtem Umtausch von Außenflüssigkeit, deren totales Volumen 1500 ccm betrug, und die dann bei 30—35° zum Volumen 50 ccm im Vakuum eingeengt wurde.

Dialyse I. Emulsinlösung 300 ccm.

Nichtdialysierte Lösung	*Dialysierte Lösung* (Innenflüssigkeit)	*Außenflüssigkeit*
$p_H = 6{,}08$	$p_H = 6{,}04$	$p_H = 5{,}73$
Trockensubstanz = 12,1 mg/ccm	Trockensubstanz = 9,2 mg/ccm.	Trockensubstanz = 14,3 mg/ccm = 2,4 mg/ccm von der ursprünglichen Lösung. Davon Kohlenhydrate (als Glucose berechnet) 3,0 mg/ccm = 21% der Trockensubstanz.
Asche = 0,84 mg/ccm = 6,94% d. Trockensubstanz	Asche nicht nachweisbar	Asche = 4,5 mg/ccm = 35% der Trockensubstanz.

Dialyse II.

Nichtdialysierte Lösung	*Dialysierte Lösung*	*Außenflüssigkeit*
$p_H = 6{,}39$	$p_H = 5{,}88$	$p_H = 5{,}88$
Trockensubstanz = 12,2 mg/ccm	Trockensubstanz = 9,7 mg/ccm	Trockensubstanz = 5,7 mg/ccm. Davon Kohlenhydrate (als Glucose berechnet) 1,3 mg/ccm = 23% der Trockensubstanz.
Asche = 0,9 mg/ccm = 7,37% d. Trockensubstanz	Asche nicht nachweisbar	Asche = 1,9 mg/ccm = 33% der Trockensubstanz.

Aschenanalyse[1]):

PO_4	75,79%
K_2O	14,55 „
CaO	7,45 „
MgO	1,48 „
SiO_2	0,32 „
Al_2O_3	Spuren
Fe_2O_3	„
Na_2O	„
	99,34%

Daraus ergibt sich, daß die ursprünglichen beiden Lösungen (bei verschiedenen Gelegenheiten bereitet), mit einem Emulsingehalt von

[1]) Diese Analyse wurde von Herrn stud. phil. *V. Andersson* gemacht.

bzw. 1,21% und 1,22%, durch die Dialyse einen Teil der Substanz verloren hatten, so daß ihr Gehalt bis bzw. 0,92% und 0,97% gesunken war.

Die in die Außenflüssigkeit ausdialysierte Substanz enthielt, außer einer geringen Menge stickstoffhaltiger Stoffe (die bei dem Erhitzen der Lösung koagulierte), einen Teil löslicher *Kohlenhydrate*, die nach Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure und Bestimmung nach *Bertrands*[1]) Methode, als Glucose berechnet, bzw. 21% und 23% von dem Trockengewicht der Substanz ausmachten. Außerdem enthielt dieselbe *anorganische* Stoffe (hauptsächlich Kalium- und Calciumphosphat) bis zu einem Gehalt von bzw. 35% und 33,3%.

Diese bei der Dialyse entfernte Substanzmischung, die *Außenflüssigkeit*, zeigte an sich keine merkbare optisch aktivierende Wirkung bei der Oxynitrilsynthese und enthielt also keine nachweisbare Menge des betr. Katalysators.

Die dialysierte Emulsinlösung, die *Innenflüssigkeit*, zeigte auch nur geringe oder keine katalytische Wirkung. Wenn aber die beiden Flüssigkeiten *gemischt* wurden, zu einem Volumen, wie vor der Dialyse, wurde wieder deutliche optische Aktivität erhalten, obgleich nicht eine so starke wie aus der ursprünglichen undialysierten Lösung.

Indessen trat beim Verwenden nur *dialysierter* Lösung eine *neue Erscheinung* auf, die ein genaues Beobachten der optischen Aktivität unmöglich machte. Wenn gewöhnliche Emulsinlösung mit dem Substrat vermischt wird, entsteht, wie früher erwähnt wurde, augenblicklich eine starke Proteinfällung, nach deren Abfiltrierung der Gang der Aktivität in der klaren Lösung leicht verfolgt werden kann. Diese Fällung enthält keine nachweisbare Menge des Katalysators, weshalb es scheint, als ob dieser aus dem Emulsin freigemacht würde und seine Wirksamkeit anfinge, wenn das Protein ausgefällt wird. Eine dialysierte Lösung ergibt aber *keine Fällung*, wenn sie dem Substrat zugesetzt wird, sondern höchstens eine starke Opalescenz. Diese verschwindet aber nicht und kann auch nicht durch Filtrieren entfernt werden, weshalb die Polarisierung in einem längeren Rohr dann unmöglich und auch in $^1/_2$ dm-Rohr so erschwert ist, daß zuverlässige Resultate nicht haben gewonnen werden können, obgleich es den Eindruck gemacht hat, daß optische Aktivität dabei *nicht* entstanden ist.

Falls aber eine solche dialysierte Emulsinlösung wieder mit Außenflüssigkeit versetzt wird, erhält man mit dem Substrat wieder die Proteinfällung, und deutliche optische Aktivität wird ausgebildet. Diese aktivierende Wirkung hängt augenscheinlich nicht von der Zuführung der organischen Bestandteile der Außenflüssigkeit (z. B. Kohlenhydrate) ab, sondern wird von den *anorganischen* Stoffen verursacht, denn allein eine Zuführung von Emulsinasche genügt, um dieselbe hervorzurufen.

[1]) Bull. de la Soc. chim. **35**, 1285. 1906.

Auch nachdem die Außenflüssigkeit eine Stunde bis 80° erhitzt worden ist, behält sie ihr Vermögen dialysierte Emulsinlösung zu aktivieren.

Hierdurch wird man etwa veranlaßt zu glauben, dies sei ein Fall von direkter Aktivierung durch einen anorganischen Aktivator, etwa Alkaliphosphat, besonders da sich zeigt, daß Zusatz von Spuren desselben sogleich reichliche Proteinfällung und gleichzeitig optische Aktivität des Substrats hervorruft. Indessen zeigten weitere Versuche, daß eine *andere Deutung* möglich ist (siehe Kap. III). Es ergab sich nämlich, daß zwar ein kleiner Zusatz von NaCl, $MgCl_2$ oder $Ca(NO_3)_2$ keine Fällung hervorrief, wohl aber eine entsprechende Menge $MgSO_4$ oder $CaSO_4$, und noch bessere Fällung wurde, wie erwähnt, mit Phosphat erhalten. Augenscheinlich wurde die Lösung nicht merkbar durch einwertige Anionen gefällt, wohl aber durch zweiwertige und noch stärker durch dreiwertige, analog den Tatsachen, die sich bei Aussalzung elektrolytfreier Albuminlösungen [*F. Hofmeister*[1])] ergeben haben. Auch Zusatz von Acetat als Pufferlösung rief eine Fällung hervor, mit begleitender optischer Aktivität des Oxynitrils.

4. *Nitrilsynthese durch nichterhitztes und durch erhitztes Emulsin.*

Versuch 12: Emulsinlösung = 1 g Emulsin + 100 ccm Wasser, filtriert. Hiervon ein Teil inaktiviert durch 1 Stunde Erhitzung bis zu 100° und Filtrierung. Reaktionsgemisch: 4,53 ccm HCN (2,06 N) + 1,0 g C_6H_5CHO + 4,53 ccm von bzw. aktiver oder inaktiver Emulsinlösung oder Wasser. Temp. 17°. Methode I. Titriertes Volumen 2 ccm. $AgNO_3$ 0,1 N.

a) Nichterhitztes Emulsin.

Stunden	Drehung in Graden	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
2	0,70	11,1	46,1	
				1,8
4	0,82	9,3	54,9	
				0,8
6	0,80	8,7	57,8	
				0,5
19	0,76	6,7	67,5	

b) Erhitztes Emulsin.

Stunden	Drehung in Graden	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
2	0	12,3	40,3	
				0,9
4	0	11,1	46,1	
				0,5
6	0	10,5	49,0	
				0,2
19	0	9,2	55,3	

[1]) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **28**, 210. 1891.

c) Ohne Emulsin.

Stunden	Drehung in Graden	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
2	0	14,0	32,0	
				0,6
4	0	12,0	37,4	
				0,2
6	0	12,6	38,8	
				0,1
19	0	11,9	42,2	
				0,2
30	0	10,3	50,0	

d) Die Reaktionsmischung verblieb ohne Emulsin während 6 Stunden. Dann wurde nichterhitztes Emulsin zugesetzt. Nach noch $1^1/_4$ Stunden ergab sich: Drehung 0,25°, $AgNO_3$ 11,7, HCN 43,2.

Hieraus ergibt sich, daß eine auf 100° erhitzte (und filtrierte) Emulsinlösung, die *nicht länger optische Aktivität verursacht*, noch eine *Steigerung* der *totalen Synthesegeschwindigkeit* hervorruft. Diese Wirkung ist folglich *nicht enzymatisch*, sondern hängt von dem Gehalt säurebindender Proteinsubstanz, die in der Lösung noch zurückbleibt, ab. Als Säure kommt hier Benzoesäure (aus dem Benzaldehyd stammend) in Betracht. Bei Verwendung auf 100° erhitzter und *unfiltrierter* Emulsinlösung wurde bei einem Parallelversuch noch größere Synthesegeschwindigkeit erreicht, weil dabei kein Proteinstoff entfernt worden war, und folglich mehr Säure gebunden werden konnte.

Wird der Katalysator zugeführt, nachdem ein Teil der Synthese schon vorsichgegangen ist, so wird eine schwächere optische Aktivität erhalten, darauf deutend, daß der Katalysator nur auf den noch nicht synthetisierten Teil des Substrats einwirkt.

5. *Für kleine Emulsinmengen ist die optische Aktivität des Substrats der Emulsinmenge proportional.* Um zu prüfen, ob bei kleinen Emulsinmengen die optische Aktivität des Oxynitrils der Menge des Katalysators proportional ist, wurde folgender Versuch gemacht.

***Versuch 13*: Substrat = 14,1 ccm HCN (1,4 N, in 96 proz. Alkohol gelöst) + 2,09 g C_6H_5CHO + 10 ccm Acetatpuffer (1 N, in 47 proz. Alkohol gelöst, p_H = 4,4). Methode II.**

a) Substrat + 10 ccm Wasser + 5 ccm Emulsinlösung.

Stunden	1/2	1	8	24	98
Drehung in Graden	0,20	0,25	0,30	0,35	0,30

$k' \cdot 10^3 = 1,0.$

b) Substrat + 8 ccm Wasser + 7 ccm Emulsinlösung.

Stunden	1/4	1	8	24	98
Drehung in Graden	0,40	0,40	0,50	0,50	0,40

$k' \cdot 10^3 = 1,3.$

c) Substrat + 5 ccm Wasser + 10 ccm Emulsinlösung.

Stunden	1/2	1	8	24	98
Drehung in Graden	0,60	0,60	0,75	0,75	0,60

$k' \cdot 10^3 = 1{,}3$.

d) Substrat + 3 ccm Wasser + 12 ccm Emulsinlösung.

Stunden	1/2	1	8	24	98
Drehung in Graden	0,80	0,80	0,90	0,85	0,65

$k' \cdot 10^3 = 1{,}5$.

e) Substrat + 0 ccm Wasser + 15 ccm Emulsinlösung.

Stunden	1/2	1	8	24	98
Drehung in Graden	1,00	1,00	1,15	1,10	0,85

$k' \cdot 10^3 = 1{,}5$.

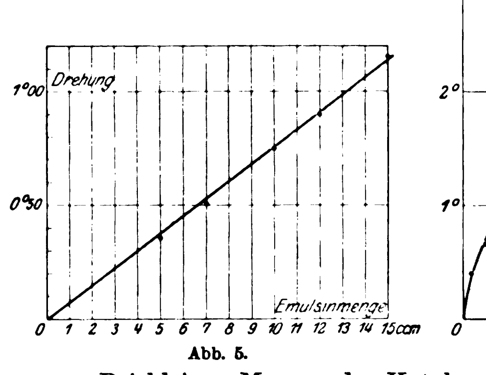


Abb. 5.

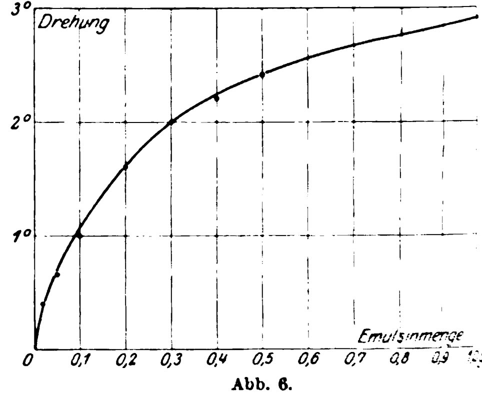


Abb. 6.

Bei kleinen Mengen des Katalysators ist also seine Wirkung seiner Menge proportional (Abb. 5).

Je nachdem die optische Aktivität ihr Maximum erreicht, bringt indessen eine weitere Vermehrung der Katalysatormenge immer geringere Wirkung mit sich, wie sich aus folgendem Versuche ergibt (Abb. 6).

Versuch 14: Das Emulsinpulver wurde mit 10 ccm Wasser während einer Stunde digeriert, wonach 10 ccm Acetatpuffer (1 N, in 47 proz. Alkohol gelöst, $p_H = 5{,}4$) und Substrat wie im vorigen Falle zugesetzt wurden.

a) 0,03 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	0,40	0,35	0,15	0,00
$k' \cdot 10^3$	—	—	13,6	—

b) 0,05 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	0,65	0,55	0,20	0
$k' \cdot 10^3$	—	—	16,3	—

c) 0,1 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	1,00	0,65	0,35	0,05
$k' \cdot 10^3$	—	11,7	10,0	10,5

d) 0,2 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	1,60	1,00	0,50	0,10
$k' \cdot 10^3$	—	12,8	11,2	10,0

e) 0,3 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	2,00	1,30	0,65	0,10
$k' \cdot 10^3$	—	11,7	11,2	10,2

f) 0,4 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	2,20	1,35	0,65	0,10
$k' \cdot 10^3$	—	12,6	11,8	10,2

g) 0,5 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	2,40	1,40	0,70	0,10
$k' \cdot 10^3$	—	14,6	14,2	10,6

h) 1,0 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	2,90	1,70	0,70	0,10
$k' \cdot 10^3$	—	14,5	14,2	10,6

Daß die optische Aktivität in dieser Versuchsreihe mit der Zeit schneller abnimmt ($k' \cdot 10^3$ = ca. 12) als in der vorhergehenden (*Versuch 13*) ($k' \cdot 10^3$ = ca. 1,3) hängt augenscheinlich von dem höheren p_H-Wert (5,4 bzw. 4,4) des Puffers ab.

III. Theoretisches.

Eine im Pflanzenreich gewöhnliche Gruppe von Eiweißstoffen ist, wie bekannt, die der *Globuline*. Sie sind in verdünnten Neutralsalzlösungen löslich, nicht aber in konzentrierten, auch nicht in reinem Wasser. Sie fallen deshalb aus, wenn der Salzgehalt der verdünnten Lösung durch weiteren Salzzusatz gesteigert wird, wie auch, wenn er durch Dialyse in zu hohem Grade vermindert wird. Da sie amphotere Elektrolyten sind, aber in überwiegendem Grad die Eigenschaften einer schwachen Säure zeigen, werden sie von Alkalien gelöst und von gewöhnlichen Säuren ausgefällt.

Ein Hauptbestandteil in Mandeln und in den Steinen anderer *Prunus*-Arten ist, wie bekannt, das Globulin *Amandin*, das folglich auch ein Hauptbestandteil im Emulsin sein dürfte und das sich mit Bezug auf Herstellungsweise und Eigenschaften diesem anschließt. Außerdem ist in meinem Emulsinpräparat ein reduzierender Bestandteil[1]) enthalten, wahrscheinlich ein *Kohlenhydrat* (*Versuch 11*), von dem möglicherweise die hier besprochene katalytische Tätigkeit herrührt. *Ohta*[2]) hat nachgewiesen, daß Emulsin, das seines ganzen Eiweißgehalts beraubt worden ist, noch immer Pentosereaktion gibt. Wie *Willstätter* und *Csányi* (l. c.) angeben, sind aber *Ohtas* Präparate sehr schwach, so daß Schlüsse aus seinen Angaben kaum gezogen werden können. Seine Wirkung bei der Oxynitrilsynthese hat *Ohta* leider nicht untersucht. Durch die Anwesenheit von (rechtsdrehendem) Kohlenhydrat kann in meinem Präparat der Stickstoffgehalt, für den ich 12,5% fand, gegenüber dem Amandin (19%) herabgesetzt sein; auch wird durch das rechtsdrehende Kohlenhydrat die Drehung meines Präparates (gefunden $-47,7°$) gegenüber der Drehung des Amandins herabgesetzt ($-56°$). Diese Verschiedenheit der Drehung kann indessen auch dadurch erklärt werden, daß, wie bekannt, die Anwesenheit von Neutralsalzen die Drehung der Eiweißstoffe herabsetzt.

Da ein Hauptbestandteil meines Präparates ein Globulin ist, lassen sich die bei der *Dialyse* beobachteten Erscheinungen (*Versuch 11*) folgendermaßen deuten: Da der Salzgehalt durch die Diffusion allzu gering wurde, fiel ein großer Teil des Präparats in unlöslicher Form aus, was sich auch dadurch zeigte, daß gegen Ende der Dialyse auf dem Boden der Kollodiumschläuche stets eine Fällung entstand. Wenn dann die zurückbleibende verdünnte Emulsinlösung dem salzfreien Substrat zugeführt wurde, blieb das Amandin in gelöstem oder wenigstens opalescierendem Zustande und rief keine optische Aktivität beim Oxynitril hervor, weil der Katalysator noch am Amandin gebunden (adsorbiert) blieb. Wenn dagegen ein geeignetes Salz, z. B. Alkaliphosphat, in genügender Menge zugeführt wurde, wurde eine Ausfällung des Amandins in grobflockiger Form erhalten, wobei die adsorbierende Fläche eine gewaltsame Verminderung erlitt, so daß der Katalysator freigemacht und optische Aktivität des Substrats erhalten wurde. Da die Emulsinlösung durch die Dialyse geschwächt worden war, konnte jedoch die optische Aktivität nicht so hohen Wert erreichen wie mit der ursprünglichen Emulsinlösung. Daß besonders Alkaliphosphat dem Emulsin größere Wirkung zu geben schien als z. B. Sulfate, kann auch auf seine Pufferwirkung zurückgeführt werden, wodurch ein größerer p_H-Wert

[1]) In Handelspräparaten von Emulsin fanden auch *Neuberg* und *Marx* (diese Zeitschr. **3**, 535. 1907) Reduktion von *Fehling*scher Lösung. *Willstätters* und *Csányis* Emulsinpräparat zeigte diese reduzierende Wirkung nicht.

[2]) Diese Zeitschr. **58**, 329. 1914.

erreicht wurde und optische Aktivität folglich schneller ausgebildet werden konnte (*Versuch 3a* und *b*).

Der anscheinend vorliegende Fall von Katalysatoraktivierung kann somit auf eine *verhinderte Ausflockung* von Globulin zurückgeführt werden.

Die *Schnelligkeit*, womit die optische Aktivität ausgebildet wird, wird augenscheinlich von der totalen Synthesegeschwindigkeit bestimmt, welche ihrerseits durch die Acidität reguliert wird. Indessen wirkt, nach meinen Versuchen (siehe S. 399), noch ein Faktor auf die optische Aktivität ein, nämlich die intramolekulare Umlagerungsgeschwindigkeit, wodurch schließlich eine Mischung gleich vieler rechts- und linksdrehender Moleküle ausgebildet wird. Die Geschwindigkeit dieser racemisierenden Umlagerung, die in dem ganzen untersuchten Aciditätsgebiet die Synthesegeschwindigkeit nicht erreicht, scheint mit steigendem p_H und mit steigender Temperatur zu steigen, wodurch die optische Aktivität schnell abnimmt. In völlig neutraler Lösung scheint die Geschwindigkeit der Inaktivierung dieselbe Höhe zu erreichen wie die Synthesegeschwindigkeit, d. h. beide werden unmeßbar groß.

Besprechungen einiger Befunde von Rosenthaler.

Durch die hier vorliegende Arbeit können mehrere der von *Rosenthaler*[1]) beobachteten Erscheinungen ihre einheitliche Erklärung finden. *Rosenthaler* findet die stärkste Drehung, wenn man einen *Überschuß* von Benzaldehyd langsam in eine Mischung von Emulsin und Cyanwasserstoff eintropfen läßt. Diese anscheinend eigentümliche Tatsache wird indessen von mir darauf zurückgeführt, daß die durch die Oxydation des Aldehyds gebildete Säure die Acidität der Mischung steigert, wodurch mit der Zeit starke optische Aktivität erreicht wird, weil dann die Inaktivierungsgeschwindigkeit immer mehr herabgesetzt wird. Bleibt dagegen die Acidität konstant erhalten, so erzeugt, wie ich gefunden habe (diese Versuche sind nicht mitgeteilt), sowohl Überschuß als unzureichende Menge von Benzaldehyd *Verminderung* im Gewinn des optisch aktiven Oxynitrils, wie auch zu erwarten ist. Dieselbe Ursache ist wohl auch der Grund der Beobachtung *Rosenthalers*, daß eine größere Drehung erhalten wird, wenn man die Mischung schüttelt. Möglicherweise kann auch seine Beobachtung, daß Anwesenheit von Äthylacetat Steigerung in der optischen Aktivität bewirkt, auf die bei ihrer teilweisen Hydrolyse freigemachte Essigsäure zurückgeführt werden. *Rosenthaler* findet weiter, daß einmal verwendetes Emulsin nicht mehr bei einem neuen Substrate optische Aktivität hervorruft, und er erklärt dies damit, daß das Emulsin von Oxynitril „beschädigt“ worden ist. Meiner Ansicht nach hat das Oxynitril den Katalysator aus dem Emulsinpräparat aufgenommen, wodurch dieses seine Wirkung verloren hat. Dies wird noch

[1]) l. c.

wahrscheinlicher durch *Bredig* und *Fiskes*[1]) Beobachtung, daß der von ihnen verwendete ähnliche Katalysator Chinin (Chinidin) vom Oxynitril aufgenommen und hartnäckig daran gebunden wurde. Endlich findet *Rosenthaler*, daß, wenn eine Lösung von optisch aktivem Oxynitril mit Emulsin versetzt wird, die optische Aktivität schneller abnimmt als in einer emulsinfreien Lösung, worin er für seine Auffassung einen Beweis sieht, daß es in Emulsin ein Oxynitril spaltendes Enzym gibt. Ohne auf die Frage, ob es sich hier um die Wirkung eines Enzyms handelt, näher einzugehen, mag bemerkt werden, daß sich *Rosenthalers* Befund darauf zurückführen läßt, daß das Emulsinpräparat aus der Lösung Säure aufnimmt, wodurch die Acidität vermindert und folglich die Inaktivierungsgeschwindigkeit gesteigert wird.

Zusammenfassung.

1. In meiner früheren Mitteilung (l. c.) ist gezeigt worden, daß, wenn Benzaldehyd und Cyanwasserstoff in Lösung in äquimolekularen Mengen vermischt werden, sie sich zu Benzoxynitril verbinden, wobei die Geschwindigkeit dieser Reaktion als Funktion der H-Ionenkonzentration dargestellt wird. Das dabei erhaltene Oxynitril ist optisch inaktiv.

2. Wenn bei dieser Reaktion *Emulsin* anwesend ist, wird die Synthese asymmetrisch geleitet, wobei sich d-Oxynitril bildet. Der in Emulsin befindliche Proteinbestandteil (Globulin) fällt hierbei in unlöslicher Form aus und ist selbst katalytisch unwirksam. Wird dieses Ausfallen (dadurch verursacht, daß das Globulin Benzoesäure aus dem Substrat bindet) verhindert, indem durch Dialyse der Salzgehalt des Emulsins weggenommen wird, oder indem die Reaktionsmischung schwach alkalisch gemacht wird, so gewinnt man kein optisch aktives Oxynitril. Die Menge des entstandenen Oxynitrils ist von der Menge anwesenden Emulsins abhängig. Bei kleinen Emulsinmengen zeigt sich vollständige Proportionalität zwischen der erreichten Drehung und der Emulsinmenge. Bei großen Mengen steigt die Drehung langsamer als die Menge Emulsinpräparat.

3. Das gewonnene d-Oxynitril ist labil, und die Drehung der Lösung nimmt von selbst ab, ohne Mitwirkung eines Enzyms oder eines anderen Katalysators. Die Geschwindigkeit, mit der die Drehung abnimmt, steigt 1. mit einem Temperaturkoeffizienten $k_{t+10} : k_t =$ ca. 3,2, nimmt 2. mit steigender Acidität innerhalb des Gebietes $p_H = 3$ bis 6,5 ab (Abb. 4) und erreicht 3. die Höhe der totalen Synthesegeschwindigkeit erst im Neutralpunkt, wo beide sehr groß werden und wo die optische Aktivität ebenso rasch verschwindet, wie sie entsteht.

4. Einige von *Rosenthaler* (l. c.) beobachtete spezielle Erscheinungen stimmen mit meinen Resultaten gut überein, finden aber hier eine von der seinigen abweichende Deutung.

[1]) Diese Zeitschr. **46**, 7. 1912.

Über die Chemie der Lunge.

II. Mitteilung[1]).

Über ein neues Phosphorsulfatid in der Lunge.

Von

Ubaldo Sammartino (Rom).

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung.)

(Eingegangen am 25. April 1922.)

Im Gehirne werden als Bestandteile der weißen Materie saure Verbindungen gefunden, welche in Wasser und Alkohol unlösliche Bariumsalze geben und von denen einige, sowohl Phosphor als auch Schwefel enthalten und daher als Phosphorsulfatide anzusprechen sind. So ist es gelungen in vor kurzem veröffentlichten Untersuchungen von *S. Fränkel* und *O. Gilbert*[2]) einen Körper darzustellen, der *Hirnsäure* benannt wird und im Molekül ein Atom Schwefel, ein Atom Phosphor und drei Atome Stickstoff enthielt. Bei der Hydrolyse dieser Substanz, deren Bariumsalz der Formel $C_{93}H_{187}N_3$, $SPBa_2O_8$ entsprach, wurden Cerebronsäure und Aminoäthylalkohol gefunden. Sonst hat man nur Phosphatide, wie das Sphingomyelin oder Sulfatide gefunden, welch letztere nach noch nicht weiter beschriebenen Verfahren von *Levene* dargestellt wurden.

Aber diese Substanzen, die bis jetzt gefunden wurden, waren durchaus sauerer Natur, um so merkwürdiger war es, daß wir bei Aufarbeitung der Lipoide der Lunge auf ein Phosphorsulfatid gestoßen sind, welches sehr schön krystallisierte, Phosphor und Schwefel und Stickstoff in der Relation 1 : 1 : 2 enthielt und keine saueren Eigenschaften zeigte, sich also von der Hirnsäure ebenso wie durch den Stickstoffgehalt, so auch durch den Mangel der salzbildenden Eigenschaften unterschied.

6 kg frischer Lunge haben wir im Vakuumtrockenschrank auf Silberplatten getrocknet und erhielten nach dem Vermahlen 1080 g Pulver. Wir extrahierten vorerst dieses Pulver mit Benzin und nachher mit siedendem Alkohol.

---

[1]) I. Mitteilung, diese Zeitschr. **124**, 234. 1921.

[2]) Diese Zeitschr. **124**, 206. 1921.

Aus der alkoholischen Lösung schied sich, wie gewöhnlich beim Abkühlen, weiße Materie ab, und die alkoholische Lösung wurde dann in der Kälte belassen. Es schied sich wieder etwas weiße Materie ab, welche mit der Hauptportion vereinigt wurde. Hierauf wurde die alkoholische Lösung im Vakuum stark konzentriert und mit Äther aufgenommen. Die ätherische Lösung wurde mit Glaubersalz getrocknet, stark eingeengt und mit Alkohol aufgenommen, um eventuell vorhandenes Cephalin abzuscheiden. Die Lösung wurde hierauf mit alkoholischer, ammoniakhaltiger Bleiacetatlösung gefällt. Es fiel nur sehr wenig Niederschlag aus, von diesem wurde abfiltriert und durch Zusatz von Schwefelsäure, sowohl Blei, als auch Ammoniak entfernt. Die alkoholische Lösung wurde hierauf im Vakuum eingeengt und mit Aceton gefällt. Es fiel eine weiße Substanz aus, die sich mit siedendem Alkohol in einen organischen und einen anorganischen Teil zerlegen ließ. Die organische Substanz fiel beim Abkühlen mit Alkohol krystallisiert aus. Alle Fraktionen gaben denselben Schmelzpunkt und zwar 197°. Die Substanz enthielt Stickstoff, Schwefel und Phosphor, gab keine Orcinreaktion, war also frei von Galaktosiden. Die Lösung zeigte keine Reaktion gegen Lackmus, die Substanz war völlig frei von Blei. Wir erhielten von dieser Substanz nur wenig, so daß wir kein genügendes Material für eine Hydrolyse hatten.

Die Elementaranalyse ergab folgenden Wert:

Stickstoffbestimmung nach *Dumas-Pregl*: 5,490 mg im Vakuum getrocknete Substanz (744 B. 18° Temp.) gaben NV 0,163 ccm, das ist 3,40% N. 2,960 mg (744 B. und 17° Temp.) gaben NV 0,090, ccm das ist 3,50% N.

Phosphorbestimmung nach *Hans Lieb*: 3,80 mg gaben Phosphorammoniummolybdat, 0,0104 mg, das ist 3,95% P.

Schwefelbestimmung: 156,520 mg im Vakuum getrocknete Substanz werden nach *Lieb* behandelt und gaben 0,03682 g $BaSO_4$, das ist 0,00505 g S, entsprechend 3,23% S.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung: 6,410 mg Substanz gaben 14,803 mg CO_2, entsprechend 62,98% C; 6,410 mg Substanz gaben 7,081 mg H_2O, entsprechend 12,36% H.

Relation: N : P : S = 2 : 1 : 1.

	C	H	N	S	P	O
Gefunden:	62,98%,	12,36%,	2,83%,	3,23%,	3,12%,	15,48%
Berechnet:	62,52 „	12,17 „	2,77 „	3,17 „	3,07 „	15,84 „

für $C_{53}H_{122}N_2S_1P_1O_{10}$.

Am wahrscheinlichsten handelt es sich hier um ein Anhydrid eines Phosphorsulfatides, da dieser Körper mit Blei keine Verbindung gab.

Über den Nachweis der fermentativen Lösung von koagulierten Proteinen mittels des Eintauchrefraktometers.

Von

Ernst Kupelwieser.

(Aus dem Institute für allgemeine und experimentelle Pathologie der Univ. Graz; Vorstand: Prof. Dr. *Hermann Pfeiffer*. Ausgeführt mit Unterstützung der fürstlich *Liechtenstein*schen Spende).

(*Eingegangen am 26. April 1922.*)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Vorbemerkung.

Zum Nachweis und zur Verfolgung der unter den Begriff des fermentativen Eiweißabbaues fallenden Vorgänge gibt es eine große Zahl von Methoden. Entsprechend dem Umstande, daß bei einem aus Substrat und dem Träger der Fermentwirkung bestehendem Reaktionssystem die mannigfaltigsten Veränderungen bezüglich des chemischen Verhaltens, wie der physikalischen Eigenschaften auftreten, die der Beobachtung zugänglich sind, wurden sehr verschiedene Merkmale als Zeichen für den Eintritt und Fortschritt der Fermentwirkung benützt. Daß mit verschiedenen Methoden nicht nur immer andere Seiten des gleichen Teilvorganges erfaßt werden, sondern auch zeitlich aufeinanderfolgende Ausschnitte aus dem von physikalischen Zustandsänderungen begleiteten stufenweisen Abbau herausgegriffen werden, ist eine Tatsache, auf die schon wiederholt hingewiesen wurde und die besonders dann zu berücksichtigen ist, wenn es sich um die Ausarbeitung einer Meßmethode handelt[1]).

Es taucht aber noch die weitere Frage auf, ob man bei Benützung so verschiedenartiger Merkmale der Fermentwirkung etwa nicht allein ein und denselben vom Ferment katalysierten Prozeß von verschiedenen Seiten und in verschiedenen Stadien zu sehen bekommt, sondern vielleicht ganz verschiedene Wirkungsweisen des Fermentes beobachtet.

Besonders berechtigt scheint diese Frage im Hinblick auf zwei Gruppen von Methoden, welche die bei der Einwirkung eiweißspaltender Fermente auf Proteine zuerst auftretenden bzw. merkbaren Veränderungen

[1]) Vgl. *S. P. L. Sörensen*, diese Zeitschr. **7**, 45. 1908.

zur Beobachtung bringen, sich also auf die Proteolyse[1]) im engeren Sinne beziehen: *Die eine Gruppe*, als deren Vertreter die *Mett*sche Methode genannt sei, arbeitet im makroheterogenen System, das aus dem festen Substrat und der Fermentlösung besteht; der beobachtete Vorgang ist die *Auflösung des Substrates* im flüssigen Anteil des Systems.

Die andere Gruppe setzt das Substrat schon in kolloider Lösung der Fermentwirkung aus, benützt also ein mikroheterogenes System; als Merkmal für die Fermentwirkung dient der Verlust einer für das ungespaltene Eiweiß charakteristischen Eigenschaft, wie der Hitzekoagulierbarkeit oder der Fällbarkeit durch bestimmte Reagenzien in bestimmten Konzentrationen. Auch das Auftreten an irgendwelchen Eigenschaften erkennbarer erster Abbauprodukte wird als Kriterium verwendet. Hierher gehört eine Reihe der auch für quantitative Zwecke am besten ausgearbeiteten Verfahren, die alle den *Zerfall des Substrates in seine Bausteine* anzeigen.

Wiewohl die mittels beider Arten von Methoden beobachteten Fermentwirkungen unter dem Namen der Proteolyse zusammengefaßt werden, scheint es doch von vornherein möglich, daß sie die katalytische Beschleunigung zweier wesentlich voneinander verschiedener Vorgänge zur Anschauung bringen. Denn es ist keineswegs sicher, daß die Lösung des koagulierten Proteins nicht anders als durch Abbau zu löslichen Spaltprodukten erfolgen kann; ebensogut könnte sie durch eine ohne Zertrümmerung des Eiweißkernes einhergehende physikalische oder chemische Veränderung verursacht sein, deren Beschleunigung eine andere Wirkungsart des Fermentes bedeutete, als die Katalyse der hydrolytischen Eiweißspaltung. Wahrscheinlich gemacht wird das Bestehen zweier in diesem Sinne auseinanderzuhaltender Vorgänge dadurch, daß auffallende Unterschiede bezüglich der Bedingungen für die nach der einen und nach der anderen Art untersuchte Wirkung derselben Fermente zutage traten[2]) und andererseits die Gebundenheit an wohldefinierte Bedingungen als Charakteristicum für die Einheitlichkeit einer Fermentwirkung gilt.

Auch ohne näher auf diese Frage einzugehen, scheint es mir entsprechend der früheren Gegenüberstellung angezeigt, die durch die Formart des Substrates unterschiedenen Methoden, welche möglicherweise ganz verschiedene Wirkungsweisen der proteolytischen Fermente erfassen, gesondert zu betrachten:

---

[1]) Im Gegensatz zu „Peptolyse".

[2]) *E. Schütz* und *Huppert*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **80**, 470. 1900. — *E. Abderhalden* und *Steinbeck*, Zeitschr. f. physiol. Chemie **68**, 293. 1910. — *E. Abderhalden* und *Chauncey*, ebendort **81**, 458. 1912. — *J. Christiansen*, diese Zeitschr. **47**, 226. 1912.

1. Zum Studium der fermentativen Spaltung gelöster Substrate stehen mehrere allgemein anwendbare Verfahren zur Verfügung, die den bei quantitativen Untersuchungen zu stellenden Forderungen weitgehend genügen. Bezüglich der Methoden dieser Gruppe verweise ich auf die kritische Zusammenstellung *C. Oppenheimers*[1]).

2. Ungleich schwieriger ist es, unter den vorhandenen Methoden, welche die Lösung fester Substrate zum Gegenstand der Beobachtung haben, eine zu finden, die bei hoher Empfindlichkeit den beobachteten Effekt innerhalb enger Fehlergrenzen zu messen gestattete und dabei nicht an die Verwendung eines bestimmten Substrates gebunden wäre. Es hängt dies u. a. damit zusammen, daß die Benützung eines makroheterogenen Systems schwer zu vermeidende Fehlerquellen mit sich bringt, von denen man beim Arbeiten im mikroheterogenen oder im homogenen System verschont bleibt. Eine erschöpfende Aufzählung der hierher gehörigen Verfahren mit ihren zahlreichen Modifikationen würde zu weit führen; es mag daher eine Kennzeichnung der Haupttypen[2]) genügen[3]):

a) Man bringt eine bestimmte Substratmenge in die Fermentlösung und mißt die zur vollständigen Auflösung des Substrates nötige Zeit.

Diese Methode ist zuerst von *E. Brücke*[4]) verwendet worden, der Fibrinflocken oder -scheibchen von hartgekochtem Hühnereiweiß als Substrat benützte.

b) Es werden bekannte Substratmengen der Fermentwirkung ausgesetzt und nach einer bestimmten Zeit wird nachgesehen, wieviel vom Substrat übriggeblieben ist.

Dies kann in verschiedener Weise geschehen, z. B. bei der ursprünglich von *Bidder* und *Schmidt*[5]) angegebenen und dann von *Ebstein* und *Grützner*[6]) modifizierten Methode so, daß der Trockenrückstand von gleichen Anfangsmengen hartgekochten Hühnereiweißes bestimmt wird, von denen die eine der Einwirkung des Fermentes ausgesetzt war. *Vernon*[7]) verwendet eine Aufschwemmung feingehackten Fibrins, dessen Volumen er am Anfang und Ende des Versuches durch Zentrifugieren in graduierten Gefäßen bestimmt. Bei der bekannten *Mett*schen Methode[8]) wird in Glasröhrchen eingesaugtes Hühnereiklar durch Erhitzen zum Koagulieren gebracht; diese Röhrchen werden in die Fermentlösung eingelegt und man kann die Auflösung des Substrates an der Längenabnahme des Eiweißzylinders direkt ablesen.

c) Wie oben werden bekannte Substratmengen der Fermentwirkung ausgesetzt, aber man mißt direkt oder indirekt die in einer bestimmten Zeit entstandene Menge löslicher Stoffe.

---

1) *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen. 4. Aufl., Bd. I, S. 374ff. Leipzig 1913.

2) Als das Typische ist hier lediglich die Art, wie die Größe des Lösungseffektes gemessen wird, betrachtet. Dieser Einteilungsgrund läßt natürlich jene Verschiedenheiten in der Versuchsanordnung unberücksichtigt, welche die vergleichsweise Messung der Wirkungsstärke von Fermentlösungen betreffen, die nur an der katalytischen Beschleunigung des untersuchten Vorganges oder einer dieser proportionalen Größe erfolgen kann; ebenso unberücksichtigt bleiben die verschiedenen Arten des Rückschließens auf die relativen Fermentkonzentrationen bzw. auf die Konzentrationen des Trägers der Fermentwirkung.

3) Literatur bei *Oppenheimer*, a. a. O.

4) *E. Brücke*, Beitr. z. Lehre v. d. Verdauung. Wiener Akad. **37**, 131. 1859.

5) *Bidder* u. *Schmidt*, Verdauungssäfte und Stoffwechsel. Leipzig u. Mitau 1852.

6) *Ebstein* und *Grützner*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **6**, 1. 1872.

7) *Vernon*, Journ. of physiol. **26**, 405. 1901.

8) *Mett*, Arch. f. Anat. u. Physiol. **1894**, S. 68. Ausführliche Literatur über Modifikationen bei *J. Christiansen*, diese Zeitschr. **46**, 257. 1912.

Bei dem von *Grünhagen*[1]) angegebenen Verfahren geschah dies zuerst einfach so, daß gleiche Volumina gequollenen Fibrins mit gleichen Mengen der Fermentlösung auf einem Filter digeriert wurden und man die in gleichen Zeiten durch das Filter gehenden Mengen gelösten Fibrins verglich. *Grützner*[2]) hat diese Methode dahin modifiziert, daß er das Fibrin färbt und die bei der Lösung des Fibrins freigewordene Farbstoffmenge colorimetrisch auswertet.

Anschließend wären noch Verfahren zu nennen, die eine Mittelstellung zwischen den mit festen und den mit kolloid gelösten Substraten arbeitenden einnehmen, indem sie die Aufhellung einer grobdispersen Zerteilung des Substrates als Kriterium für die Fermentwirkung benützten.

Von dieser Art ist die Methode von *Jacoby*[3]), bei der die unter der Einwirkung des Fermentes eintretende Aufhellung einer trüben Ricinlösung beobachtet wird. *Hata*[4]) verwendet in ähnlicher Weise eine auf 60° erhitzte Eiweißsuspension.

Die hier nur in einigen typischen Beispielen angeführten Verfahren sind zwar in ihren zahlreichen Ausarbeitungen in der einen oder der anderen Richtung vervollkommnet worden, aber die Eigenschaften: Hohe Empfindlichkeit, enge Fehlergrenze und Anwendbarkeit auf beliebige von proteolytischen Fermenten angreifbare feste Substrate finden sich bei keiner vereinigt. Wenn auch einzelne Untersuchungsarten die beiden erstgenannten Eigenschaften besitzen, so sind sie doch bezüglich der Wahl der Substrate auf einen engen Willkürbereich beschränkt, so daß sie wohl geeignet sind, die Wirkung verschiedener Fermente auf gewisse vorgegebene, nicht aber auch auf verschiedene Substrate zu untersuchen. Die dritte Eigenschaft haben andererseits bestimmte, auch mit makroheterogenen Systemen arbeitende Verfahren, die für den besonderen Zweck des Nachweises der „Abwehrfermente“ im Blutserum ausgearbeitet sind, wobei das Hauptgewicht auf große Empfindlichkeit gelegt werden mußte; besonders gilt dies von der „interferometrischen Methode“ von *P. Hirsch*[5]) und der von *F. Pregl* und *M. de Crinis*[6]) angegebenen „Mikro-Abderhalden-Reaktion“.

Es sind Verfahren vom Typus c), denn die Beobachtung ist weder auf das verschwindende, noch auf das an Menge abnehmende Substrat gerichtet, sondern auf die unter der Einwirkung des Fermentes entstehenden löslichen Stoffe. Und zwar benützen beide Methoden die Änderung des Brechungsquotienten der flüssigen Phase des Reaktionssystems als Zeichen für deren Konzentrationszunahme, die unmittelbar bedingt ist von der nur bei Gegenwart des Fermentes erfolgenden Lösung des festen Substrates.

Aus Anlaß von Versuchen über Proteolyse und deren Beeinflussung, die außerhalb des Rahmens dieser Mitteilung liegen, habe ich die letztgenannte Methode, die von ihren Autoren als Indicatormethode für den Nachweis von Abwehrfermenten angegeben wird, zu Untersuchungen über andere Fermente benützt und hierbei besonders die quantitativen Verhältnisse berücksichtigt, da es mir für meine Zwecke darauf ankam, daß die Methode nicht nur eine stattgehabte Fermentwirkung mit bekannter Empfindlichkeit *anzeige*, sondern auch quantitative Schlüsse auf den beobachteten Effekt ermögliche. Das nach dieser Richtung hin ausgestaltete Verfahren sei im folgenden beschrieben, da es in der über seine ursprüngliche Be-

1) *A. Grünhagen*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **5**, 203. 1872.
2) *P. Grützner*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **8**, 452. 1874 und **106**, 463. 1905.
3) *M. Jacoby*, diese Zeitschr. **1**. 53. 1906 und **10**, 229. 1908.
4) *S. Hata*, diese Zeitschr. **23**, 179. 1909.
5) *P. Hirsch*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**, 440. 1914, vgl. *P. Hirsch* und *F. Löwe*, Fermentforschung **3**, 311. 1920.
6) *F. Pregl* und *M. de Crinis*, Fermentforschung **2**, 58. 1917.

stimmung hinausgehenden Erweiterung zur *quantitativen Untersuchung* der *fermentativen Auflösung koagulierter Proteine* im allgemeinen anwendbar ist; außerdem soll die Beschreibung und Diskussion der Fehlerquellen als methodische Unterlage dienen für später mitzuteilende Anwendungen in noch nicht abgeschlossenen Versuchen. Die Angaben dieser Mitteilung betreffen vor allem die Untersuchung wässeriger Fermentlösungen; im Hinblick auf die Serumfermente beziehe ich aber auch die beim Arbeiten mit Serum eintretenden methodischen Besonderheiten mit ein.

Ich ging aus von der Originalvorschrift, die *Pregl* und *de Crinis* für den *mikroanalytischen Nachweis von Abwehrfermenten* geben. Sie lautet:

„Wir geben in ein kleines Gläschen mit einem Durchmesser von 4—6 mm und einer Länge von 30—40 mm (sehr gut eignen sich dazu die leer gewordenen Stoffbehälter mit sehr gut passendem Gummistopfen, in denen 0,1 g Ninhydrin in Handel gebracht wird) nach dem Augenmaß mit der Messerspitze eine kleine Menge, etwa 0,01 g des betreffenden Trockenorganes[1]), füllen das Gläschen mit kochender 0,86 proz. Chlornatriumlösung an und lassen es dann etwa eine Stunde stehen. Durch die kochende Kochsalzlösung werden auch Keime getötet, die den Versuch stören könnten. Ein späterer Zusatz von Thymol, welches im Serum praktisch unlöslich ist, stört die optische Bestimmung nicht, sobald man es nicht in gepulvertem Zustande, sondern in Form eines Kryställchens anwendet. Die über dem nun vollständig gequollenem Organprotein stehende Kochsalzlösung wird mit einer feinen Pipette und schließlich mit einer Glascapillare möglichst vollständig abgesaugt. Nun läßt man 3—4 Tropfen (!) Serum aus einer frisch gezogenen Capillare in das Gläschen einfließen, verschließt es luftdicht mit einem Gummistöpsel und schwenkt gut um, damit sich die allenthalben noch anhaftenden geringen Reste der Kochsalzlösung mit dem zugesetzten Serum innig mengen. Nach 5—10 Minuten zentrifugiert man und entnimmt daraus mit einer neuen Capillare ein Tröpfchen, bringt es auf das Hilfsprisma (des *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometers, das die Autoren benützen) und bestimmt den Brechungsindex. Nach 24stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur — die Anwendung des Brutschrankes ist durchaus nicht erforderlich — erfolgt die zweite Bestimmung wieder nach Anwendung der Handzentrifuge, um dem Gläschen einen klaren Tropfen leicht entnehmen zu können."

Die Untersuchung der Anwendbarkeit dieses Verfahrens zum quantitativen Studium der fermentativen Lösung fester Substrate mußte auf folgende Hauptfragen gerichtet sein:

I. Wie genau ist der zur Beobachtung kommende Effekt definiert?

II. Welche Wirkungsweise des Fermentes erfaßt die Methode? Im Besonderen: Ist die Änderung des Brechungsindex **nur** *eine Funktion der in Lösung gegangenen* **Menge** *oder ist sie außerdem noch abhängig vom weiteren Abbau des schon gelösten Substrates?*

III. Was für eine Funktion der gelösten Substratmenge ist die Zunahme des Brechungsindex?

IV. Inwieweit lassen sich Aussagen über die Fermentkonzentration machen?

Die auf diese Fragen gerichteten Versuche mußten mit leicht immer wieder herstellbaren Anfangsbedingungen angestellt werden, weshalb es notwendig war, die Fermentlösung aus einem haltbaren Trockenpräparat zu bereiten. Als solches verwendete ich ein sehr wirksames Trypsinpräparat der Firma Merck (Darmstadt) vom Jahre 1913, dessen Wirksamkeit sich in den letzten 2 Jahren nicht merklich geändert hat. Die Wahl von Trypsin als Ferment geschah aus dem Grunde, weil

[1]) Über die *Pregl*sche Herstellungsart der Substrate siehe *F. Pregl*, Fermentforschung **1**, 7. 1914.

es neben der „proteolytischen" auch eine „peptolytische" Komponente[1]) besitzt und daher besonders geeignet war zur Entscheidung der Frage, ob der weitere Abbau des schon gelösten Substrates in unserem Versuchsbereich einen merkbaren Einfluß auf den Brechungsquotienten der Lösung habe. Als Substrate nahm ich verschiedene nach den *Pregl*schen Angaben bereitete Trockenorganproteine, sowie in ähnlicher Weise[2]) hergestellte Trockenproteine aus Seren und aus Hühnereiweiß.

I. Wie genau ist der zur Beobachtung kommende Effekt definiert?

Zur Beantwortung dieser Frage mußte untersucht werden, innerhalb welcher Fehlergrenzen die Methode unter gleichen Umständen gleiche Ausschläge gibt. Erst auf Grund der Kenntnis der Fehlergrenzen konnten bestimmte Aussagen über die quantitative Zuverlässigkeit und die Empfindlichkeit der Methode sowie über die Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse gemacht werden.

Die Vorversuche, die nach der Originalvorschrift der Autoren mit dem einzigen Unterschied ausgeführt wurden, daß an Stelle eines zu untersuchenden Serums die Fermentlösung getreten war, ergaben zwar eindeutige Resultate, aber einen sehr weiten Schwankungsbereich der Ausschläge. Anderes war auch nicht zu verlangen, da ja die ursprüngliche Methode nur für den *qualitativen Nachweis* von Abwehrfermenten ausgearbeitet worden war. Um zu erfahren, durch welche Modifikationen sich — ohne wesentliche Beeinträchtigung der Empfindlichkeit — eine Einengung der Fehlergrenze erzielen lassen könnte, suchte ich zunächst möglichst alle Fehlerquellen ihrer Größenordnung nach festzustellen; dann konnte entschieden werden, welche von ihnen man vernachlässigen könne und welche berücksichtigt werden müssen, wenn man unter gleichen Umständen in möglichst engen Grenzen gleiche Ausschläge erhalten will.

Der Gesamtfehler einer Untersuchung setzt sich zusammen:

Ia. Aus den Fehlern, mit denen die Bestimmung der Brechungsindices behaftet sind, und

Ib. dem Fehler des Fermentversuches selbst.

Es sei daher zunächst die Bestimmung des Brechungsindex und hierauf der Fermentversuch nebst den betreffenden Fehlerquellen behandelt.

Ia. Die Bestimmung des Brechungsindex.

Das konstante Verhältnis, in dem beim Übergang eines Lichtstrahles aus einem lichtdurchlässigen Körper in einen anderen der Sinus des Einfalls- zum Sinus des Brechungswinkels[3]) steht, bezeichnet man als das Brechungsverhältnis des zweiten Mediums gegen das erste. Man ist übereingekommen, sich als erstes Medium immer das Vakuum (oder in Annäherung an dieses Luft) zu denken und spricht dann vom Brechungsexponenten oder Brechungsindex eines Körpers schlechthin. Außer von der Beschaffenheit des betreffenden Körpers ist der Brechungsexponent noch von der Temperatur abhängig und nur für Licht einer bestimmten Wellenlänge definiert. Kurz wird er auch mit dem Symbol „n" bezeichnet, dem man den Buchstaben der *Fraunhofer*schen Linie, für deren Wellenlänge die Angabe gilt, als Index beifügt („n_D" heißt: Brechungsindex für Licht von der Wellenlänge der Natriumlinie D, das ist 589 $\mu\mu$). Zur Bestimmung des Brechungsindex von Flüssig-

[1]) Womit nur das vereinigte Vorkommen dieser beiden Fermentwirkungen gemeint ist, ganz abgesehen von der Frage, ob das „Trypsin" als einheitliches Ferment oder als Fermentgemisch aufgefaßt werden muß.

[2]) Siehe S. 434, Anm. 2.

[3]) Die Winkel von dem in jedem Medium auf die Trennungsfläche gefällten Lot gegen den Lichtstrahl hin gemessen.

keiten gibt es eine größere Anzahl von Apparaten; die für biologische Untersuchungen angewendeten sind von *Biehringer*[1]) zusammenfassend beschrieben worden.

A. Beschreibung der von mir benutzten Apparatur.

1. Das Eintauchrefraktometer.

Wie *Pregl* und *de Crinis* bediente ich mich des *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometers[2]) unter Anwendung des Hilfsprismas mit dem von *Pregl*[3]) angegebenen kleineren Ausschliff, der die n_D-Bestimmung in einem Minimum von Flüssigkeit auszuführen gestattet. Bezüglich der Beschreibung des Eintauchrefraktometers verweise ich auf *Biehringer*[4]).

Die beiden von mir zu allen folgenden Versuchen gebrauchten Instrumente (Nr. 13 807 und Nr. 13 808 der Firma C. Zeiß) waren mit der bei neueren Modellen üblichen Blendvorrichtung versehen. Sie besteht aus einem am Okularende angebrachten Ring, der eine Spaltblende trägt, deren beide parallel zur Grenzlinie einstellbaren Kulissen jede für sich verschiebbar sind; dadurch ist es möglich, dem Spalt nicht nur verschiedene Breite, sondern auch verschiedene Exzentrizität zu geben. Mit einer eigenen Lupe kann man während des Einstellens der Blende das vom Okular entworfene Bild des zwischen den Prismen befindlichen Flüssigkeitstropfens beobachten. Die Vorrichtung dient zur Abblendung jener die Deutlichkeit der Grenzlinie beeinträchtigenden Strahlen, die nicht an ihrer Erzeugung teilnehmen und die in um so größerer Zahl das Auge des Beobachters treffen, je kleiner der untersuchte Flüssigkeitstropfen ist.

Beide Instrumente hätten einer Nachjustierung bedurft, da die bei destilliertem Wasser gefundenen n_D-Werte etwas vom Sollwert abwichen; es wurde aber auf eine solche verzichtet, weil es sich ja bei allen folgenden Untersuchungen lediglich um n_D-Differenzen und die Vergleichbarkeit der Resultate handelte.

2. Die Beleuchtung.

Als Lichtquelle diente eine 100kerzige Osramlampe, die so aufgestellt war, daß die Entfernung der Ebene des Glühringes vom Beleuchtungsspiegel etwa 35 cm betrug. Die Lampe wurde mit einem entsprechenden Schirm versehen und am Refraktometer selbst brachte ich einen Pappdeckel, der nur einen Ausschnitt für das Okularende hatte, so an, daß das Auge des Beobachters gegen das direkte, wie auch gegen das von der Wasseroberfläche des Temperierbades reflektierte Licht der Lampe geschützt war.

3. Die Temperiereinrichtung.

Wegen der Abhängigkeit des n_D von der Temperatur müssen die Bestimmungen, um vergleichbar zu sein, bei gleicher Temperatur erfolgen, und zwar ist es üblich, sie bei +17,50° vorzunehmen. Das Instrument wird daher mit seinem die Prismen enthaltenden Teil in ein Wasserbad von der gewünschten Temperatur getaucht.

---

[1]) Siehe *J. Biehringer*, Optische Untersuchungsmethoden in *Abderhaldens* Handbuch d. biochem. Arbeitsmethoden Bd. I, 567 ff. 1910. Das von *Biehringer* noch nicht behandelte Interferometer findet man beschrieben bei *P. Hirsch*, Die interferometrische Methode usw. Ebendort Bd. VIII, S. 561. 1915.

[2]) *C. Pulfrich*, Zeitschr. f. angew. Chemie, 1899.

[3]) a. a. O.,

[4]) a. a. O. (als Temperierbad wurde nicht der dort beschriebene Trog, sondern der Topf von der Zeißschen Temperiereinrichtung C, Meß 165 mit dem dazugehörigen Spiegelhalter benützt, wie dies auch *Pregl* und *de Crinis* tun).

Als Gefäß für das Temperierbad benützte ich den dem Instrument beigegebenen Topf von ca. 10 Liter Inhalt, der mit den beim *Ostwald*schen Thermostaten gebräuchlichen Einrichtungen zur automatischen Temperaturregulierung versehen wurde; diese gewährt im Vergleich mit dem (von der Firma Zeiß u. a. empfohlenen) Verfahren, die Temperatur durch Zugießen von kaltem oder warmem Wasser zu regeln, neben der größeren Sicherheit auch eine bedeutende Arbeitsersparnis.

Im einzelnen geschah die Temperaturregulierung wie folgt: Die Durchleitung eines konstanten Kaltwasserstromes durch das außerdem gegen direkte Sonnenbestrahlung geschützte Temperierbad sorgte zunächst dafür, daß die Temperatur des Bades unter die gewünschte Temperatur auch dann sank, wenn die des Zimmers höher war. Die Heizvorrichtung bestand aus einem kleinen Gasbrenner mit einem Toluolregulator von ca. 150 ccm Inhalt. Ein Flügelradrührer besorgte die Durchmischung des Bades.

Auf diese Weise konnte die Temperatur innerhalb eines Schwankungsbereiches von höchstens $\pm 0,1°$ mühelos konstant erhalten werden. Außerdem erfolgten die Schwankungen mit einer Periode von etwa 2—3 Minuten um die gewünschte Temperatur als Mittelwert, während die Prismen nur recht langsam (siehe später) die Temperatur ihrer Umgebung annehmen, so daß sie an diesen relativ raschen Schwankungen des Bades kaum merklich teilnehmen dürften.

B. Ausführung der Bestimmung.

Nach sorgfältiger Reinigung der Glasteile des Instrumentes durch Abspülen mit destilliertem Wasser und vorsichtigem Abtrocknen mit einem Leinwandlappen wird ein Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit mittels einer Capillarpipette auf den Ausschliff des Hilfsprismas gebracht, dieses in die über das Hauptprisma gestülpte Metallhülse so eingeschoben, daß die Hypotenusenflächen der beiden Prismen aufeinanderzuliegen kommen, und dann wird das Bodenstück der Metallhülse aufgesetzt. Das so beschickte Instrument hängt man in das auch den Beleuchtungsspiegel tragende Gestell und stellt nun Spiegel, Blende und Kompensator so ein, daß das Bild kontrastreich, die Grenzlinie farblos und scharf wird. Dann muß man warten, bis die Prismen und mit ihnen das Beschickungsmaterial die Temperatur des Bades angenommen haben, was man daran erkennt, daß mehrere in Zwischenräumen aufeinanderfolgende Ablesungen keinen Gang mehr zeigen. Hierauf kann die endgültige Ablesung erfolgen.

Es seien nun die bei der n_D-Bestimmung in Betracht kommenden Umstände einzeln besprochen und die zur Ermittlung ihres Einflusses auf die Genauigkeit des Resultates unternommenen Versuche zusammengestellt:

1. Die zu einer Bestimmung nötige *Flüssigkeitsmenge* ist eine sehr geringe. Ich habe n_D-Bestimmungen noch mit 0,02 ccm ausgeführt, ohne daß dadurch die Schärfe der Grenzlinie beeinträchtigt worden wäre. Im allgemeinen entnehme ich mit einer Mikropipette der zu untersuchenden Flüssigkeit 0,05 ccm, wovon etwa 0,04 ccm auf das Hilfsprisma gelangen.

2. Beim *Zusammensetzen des Instrumentes* kommt es darauf an, daß das Hilfsprisma wirklich fest am Hauptprisma liegen bleibt; der kleine am Hilfsprisma angebrachte Stoppel, der dazu dient, es in seiner Stellung festzuhalten, muß daher öfters erneuert werden, weil er, durch wiederholten Gebrauch zusammengequetscht, seinen Zweck nicht mehr erfüllt.

3. Die *Einstellung des Kompensators* soll so geschehen, daß die Grenzlinie farblos und scharf erscheint: Dann entspricht der gefundene Wert dem Brechungsindex für Licht der Natriumlinie D.

Wenn man in das beschickte Instrument hineinschaut und dabei den Kompensator etwas um seine Mittellage hin und her dreht, so sieht man, wie sich die Grenz-

linie in dem Maß, wie sie rötlich oder bläulich wird, nach der einen bzw. nach der anderen Seite verschiebt, was damit zusammenhängt, daß das eine Mal schwächer, das andere Mal stärker brechbares Licht am Zustandekommen der Grenzlinie mitbeteiligt ist. Beim Einstellen des Kompensators auf Farblosigkeit bemerkt man, daß es ein, wenn auch kleines, aber merkliches Bereich gibt, innerhalb dessen er verschoben werden kann, während die Grenzlinie noch farblos bleibt, ihre Lage sich aber zu ändern scheint. Der folgende Versuch sollte feststellen, ob dies etwa auf das Meßergebnis von Einfluß sein könne.

Versuch: n_D-Bestimmung von gewöhnlichem destillierten Wasser bei + 17,5 ± 0,01° C unter sonst gleichen Umständen, aber verschiedenen Kompensatorstellungen. Die 4 Ablesungsreihen sind bei einer Beschickung des Refraktometers und unmittelbar nacheinander gemacht.

Tabelle I.

Grenzlinie	deutlich bläulich	farblos	farblos	deutlich rötlich
Kompensator-stellung *)	4,8	5,1	5,2	5,5
Ablesungen in Skalenteilen	15,23	15,16	15,18	15,15
	15,23	15,18	15,19	15,16
	15,24	15,17	15,17	15,14
	15,22	15,18	15,18	15,16
	15,23	15,18	15,16	15,15
	15,21	15,18	15,18	15,15
	15,22	15,17	15,18	15,16
	15,24	15,17	15,18	15,17
	15,23	15,18	15,19	15,16
	15,23	15,18	15,18	15,16
Mittel	15,23	15,17	15,18	15,16
n_D	1,33329	1,33326	1,33327	1,33326

*) In Teilstrichen der Kompensatorskala angegeben; Zehntel geschätzt.

Man sieht, daß Unterschiede in der Kompensatorstellung, selbst beim Überschreiten des beim Einstellen auf Farblosigkeit der Grenzlinie leicht einzuhaltenden Bereiches, den gefundenen n_D-Wert kaum merklich beeinflussen; solange die Grenzlinie farblos ist, stimmen die gefundenen Brechungsindices bis auf den Fehler der Bestimmung[1]) überein (Spalte 2 und 3 der Tabelle I). Überdies erfolgt die Neueinstellung des Kompensators bei einiger Übung mit großer Genauigkeit immer wieder zur gleichen Lage: So wichen z. B. die 12 Einstellungen im Versuch S. 427, Tabelle V (also auch bei verschiedenen Spiegel- und Blendenstellungen), an der Kompensatorskala kontrolliert, nicht merklich voneinander ab. Es ist also kein Einfluß des Neueinstellens auf das Meßresultat zu erwarten und in Übereinstimmung damit zeigen im Versuch S. 427, Tabelle V, die bei unveränderter Kompensatorstellung gemachten n_D-Bestimmungen $I/_1$—$V/_1$ keine engere Fehlergrenze als die Bestimmungen $V/_2$ bis $X/_2$, bei denen der Kompensator jedesmal neu eingestellt worden war.

4. Die *Stellung des Spiegels und der Blende* wählt man zweckmäßig so, daß das Bild kontrastreich wird, ohne daß man dabei die Helligkeit der erleuchteten Gesichtsfeldhälfte als blendend empfindet; dies läßt sich bei verschiedenen Spiegel-

[1]) Siehe bei den Fehlergrenzenversuchen S. 428.

und Blendenstellungen erreichen. Bei Untersuchung von Flüssigkeiten wie Wasser physiologischer Kochsalzlösung, wässerigen Fermentlösungen geringer Konzentration usw., bei denen man (richtige Einstellung des Kompensators vorausgesetzt) von vornherein eine scharfe Grenzlinie bekommt, ist die Spiegel- und Blendenstellung in weiten Grenzen ohne Einfluß auf die scheinbare Lage der Grenzlinie; man kann dies im Versuch S. 427, Tabelle V, daran erkennen, daß die n_D-Bestimmungen IV/$_2$ bis X/$_2$, die bei absichtlich verschiedenen Spiegel- und Blendenstellungen erfolgten, nicht weniger gut übereinstimmen, wie die bei unveränderter Stellung gemachten Bestimmungen 1/$_1$ bis IV/$_1$.

Man braucht daher nur auf Herstellung eines optimalen Verhältnisses zwischen Helligkeitsunterschied der Bildhälften und Gesamthelligkeit zu achten.

Anders beim Serum[1]):

Bei der Untersuchung von unverdünntem oder nur wenig verdünntem Serum gelingt es u. U. nur schwer, eine scharfe Abgrenzung zwischen hellem und dunklem Feld zu erhalten. Öfters erscheint die Grenze auch nach dem Einstellen des Kompensators nur bei ganz bestimmten Spiegelstellungen halbwegs deutlich und auch dann nur als eine mehrere Zehntel-Skalenteile breite Übergangszone, nicht als scharfe, unstetige Grenze zwischen Hell und Dunkel, wie es für eine brauchbare Ablesung erforderlich wäre.

Nimmt man nun die Blende zu Hilfe, so bringt man wohl meist eine scharfe Grenzlinie zustande, aber man bemerkt bei wiederholter Neueinstellung der Blende, daß die Grenzlinie nicht immer wieder genau an derselben Stelle auftritt, sondern ihre Lage mit der Blendenstellung innerhalb der obenerwähnten Zone ändert. Da andererseits das Ändern der Spiegelstellung bei einmal eingestellter Blende neuerliches Unscharfwerden der Grenze zur Folge hat, wird man auch zu einer entsprechenden Neueinstellung der Blende gezwungen. Wieviel die damit verbundene Verschiebung der Grenzlinie bei der n_D-Bestimmung eines Serums ausmachen kann, zeigt das folgende Beispiel:

Versuch: n_D-Bestimmung von Serum (Mensch) bei $+17{,}5 \pm 0{,}03\,°C$ unter sonst gleichen Umständen aber verschiedener Spiegel- und Blendenstellung. Die Bestimmungen sind bei einer Beschickung und unmittelbar nacheinander gemacht. Die angegebenen Skalenteile sind Mittelwerte aus je 10 Ablesungen.

Tabelle II.

Spiegel	Blende	Skalen-Teile	n_D
Spiegel eingestellt	ohne Blende	52,(4)*)	1,347(39)
bleibt eingestellt	Blende eingestellt	52,57	1,34745
" "	neu "	52,28	1,34734
neu "	bleibt "	52,(3)*)	1,347(35)
bleibt "	neu "	52,55	1,34744
neu "	" "	52,82	1,34754
" "	" "	52,32	1,34736

*) Grenze unscharf; Skalenteite daher schon in der ersten, n_D in der vierten Dezimale unsicher.

In dem angeführten Beispiel weichen die einzelnen Werte bis zu 20 Einheiten der 5. Dezimale des n_D voneinander ab; man hätte also im Fermentversuch mit einem solchen Serum bereits bei der n_D-Bestimmung mit einem Fehler dieser Größenordnung zu rechnen.

[1]) Bezieht sich auf Menschen-, Kaninchen- und Meerschweinchensera; über andere habe ich keine Erfahrung.

Es liegt nahe, diesem Übelstand, der übrigens keineswegs bei jedem Serum und auch nicht immer in dem Maße auftritt, womöglich dadurch zu vermeiden, daß man beim Serum die Bestimmungen von Brechungsindices, die verglichen werden sollen, bei gleicher Spiegel- und Blendenstellung macht. Tatsächlich stimmen bei gleicher Spiegel- und Blendenstellung ausgeführte Messungen sehr gut überein, auch wenn die bei verschiedenen Stellungen bestimmten Brechungsindices desselben Serums große Abweichungen erkennen lassen (vgl. bei Versuch S. 431, Tabelle IX). *Ich vergleiche daher beim Arbeiten mit Serum grundsätzlich nur Brechungsindices, die bei gleicher Spiegel- und Blendenstellung gemessen sind.* Da das Eintauchrefraktometer keine Vorrichtung besitzt, um die Stellung des Spiegels und der Blende kenntlich zu machen und wieder herstellen zu können, bleibt nichts anderes übrig als die Spiegel- und Blendenstellung der ersten n_D-Bestimmung bis zur zweiten ungeändert zu lassen, was meist den Nachteil hat, daß man mit einem Instrument verschiedene Seren nicht alternierend untersuchen kann.

5. *Das Ablesen*: Die Regel lautet, daß man die Grenzlinie durch Drehen der rechts vom Okular angebrachten Mikrometerschraube mit dem nächstniederen Teilstrich der im Gesichtsfeld liegenden Hauptskala zur Koinzidenz zu bringen habe. Dann liest man an der Hauptskala die ganzen, an der Mikrometertrommel die Zehntelskalenteile ab; die Hundertel können geschätzt werden. Eine dem Instrument beigegebene Tabelle dient zur direkten Umrechnung der gefundenen Skalenwerte in Brechungsindices.

Das Kriterium kann aber noch schärfer gefaßt werden, denn es zeigt sich, daß es ein nicht unbedeutendes Intervall gibt, innerhalb dessen man vom Zusammenfallen der Grenzlinie mit einem Teilstrich der Skala sprechen kann. Dies kommt daher, weil die Grenzlinie, wenn sie scharf ist, als Grenze zwischen hellem und dunklem Feld eine Linie im strengen Sinne darstellt, während die Teilstriche der Skala Streifen von merklicher Breite sind. Legt man die Grenzlinie an dem betreffenden Teilstrich einmal so an, daß der Teilstrich mit seiner ganzen Breite im *hellen* Feld bleibt, das andere Mal so, daß er im *dunklen* Feld eben verschwindet, so ergibt sich zwischen den diesen beiden Einstellungen entsprechenden Ablesungen eine Differenz von 2 Teilen der Mikrometertrommel = 0,2 Skalenteilen; dies entspricht einer n_D-Differenz von 0,00007—0,00008, wobei die erste Einstellung den kleineren Wert liefert. Richtig wäre es daher, so vorzugehen, daß man eine bestimmte Anzahl von Ablesungen bei der einen, ebensoviele bei der anderen Stellung macht und als endgültigen Wert das arithmetische Mittel nimmt. Wiederholte Messungen in verschiedenen Bereichen der Skala haben ergeben, daß die von mir benutzten Instrumente überall die gleiche Strichdicke hatten, die stets einer Differenz von 0,2 Skalenteilen entsprach. Da es bequemer ist, mit der Einstellungsart nicht abzuwechseln und sich überdies herausstellte, daß die erste Art besser übereinstimmende Werte ergibt, verfahre ich wie folgt:

Ich stelle auf das Verschwinden der Helligkeit zwischen Skalenteilstrich und dunkler Hälfte des Gesichtsfeldes ein, so daß also der Teilstrich selbst im hellen Felde bleibt. Nun werden die ganzen und Zehntelteilstriche abgelesen, die Hundertel geschätzt und die so gewonnene Zahl um 0,1 Skalenteil vermehrt, was in Anbetracht der doppelt so großen Strichdicke einen Wert ergibt, der einer Einstellung auf die Mitte des Skalenteilstriches entspricht[1]). Zur Berechnung des n_D benütze ich dann das arithmetische Mittel aus mindestens 10 solchen Ablesungen.

[1]) Nur in einem Sonderfall gehe ich von dieser Einstellungsart ab: Wenn die Grenzlinie nur um etwa 0,1 Skalenteil von einem Teilstrich der Hauptskala abliegt, so kann man den Versuch machen, sie einmal — wie vorgeschrieben — an den nächstniederen, dann aber auch an den nächsthöheren Skalenteilstrich anzulegen;

Durch diese Eliminierung des durch die Strichdicke der Hauptskala verursachten Fehlers läßt sich die Genauigkeit der Ablesung so steigern, daß die einzelnen Werte einer Ablesungsreihe bis auf wenige der geschätzten Hundertel übereinstimmen[1]), während man die Fehlergrenze der Ablesung sonst häufig bis $\pm$ 0,1 Skalenteil angegeben findet; dies entspricht genau dem durch Vernachlässigung der Strichdicke bedingten Fehler.

6. *Einfluß der Temperatur auf die* n_D-*Bestimmung*: Für die hier in Betracht kommenden Flüssigkeiten und Temperaturen nehmen die abgelesenen Skalenteile und damit die aus ihnen berechneten n_D-Werte mit steigender Temperatur ab. Die Größenordnung dieses Temperatureinflusses im Bereich + 17,5 $\pm$ 0,5° C ist aus Tabelle III ersichtlich.

Ein Schwanken der Temperatur um $\pm$ 0,5° C bewirkt also im Bereich von 17,5° C bei destilliertem Wasser eine Änderung von + 4, bei Serum eine solche von $\mp$ 2 Einheiten der 5. Dezimale des n_D; es entsprächen somit Temperaturschwankungen von $\pm$ 0,1° C n_D-Änderungen von + 0,000008 bzw. von + 0,000005, Beträge, die in beiden Fällen den mittleren und auch den wahrscheinlichen Fehler[2]) der Bestimmung unterschreiten. Da, wie S. 420 erwähnt, die Schwankungen des Temperierbades selbst im ungünstigsten Falle nie größer als + 0,1° C waren, so genügt die dort beschriebene Temperaturregulierung den zu stellenden Anforderungen.

7. *Die Temperierzeit*: Es ist natürlich für die Richtigkeit einer n_D-Bestimmung ausschlaggebend, daß die endgültigen Ablesungen erst vorgenommen werden, wenn die Prismen und mit ihnen die Flüssigkeitsprobe die Temperatur des Temperierbades angenommen haben. Man könnte sich zwar in jedem einzelnen Falle

---

vergleicht man die in beiden Fällen gefundenen Werte, so findet man einen merklichen Unterschied. Zum Beispiel bei einem Serum (Mensch):

	Skalenteile	n
Grenzlinie angelegt an den Teilstrich 57 . .	57,88 + 0,1 = 57,98	1,34948
„ „ „ „ „ 58 . .	58,10 + 0,1 = 58,20	1,34954

Handelt es sich nun um den Vergleich zweier n_D-Bestimmungen eines solchen Serums, bei dem man eine kleine n_D-Zunahme erwartet, so wird man bestrebt sein, die zu vergleichenden Werte durch Ablesung am *gleichen* Teilstrich der Hauptskala zu gewinnen. Darum nehme ich in solchen Fällen bei der ersten n_D-Bestimmung eine Ablesungsreihe am nächstniederen und eine am nächsthöheren Skalenteilstrich vor, damit wenn im Falle einer n_D-Zunahme die Grenzlinie zur Zeit der zweiten Bestimmung den letzteren Teilstrich schon überschritten hat, ein an diesem Skalenstrich abgelesener Wert zum Vergleich zur Verfügung steht.

Nun kann es aber vorkommen, daß die Einstellung am nächsthöheren Teilstrich noch nicht so möglich ist, daß der Teilstrich in die helle Gesichtsfeldhälfte zu liegen kommt: In diesem Sonderfalle gehe ich von der sonst angenommenen Einstellungsart ab und stelle auf das Verschwinden des Teilstriches im dunklen Feld ein; hier muß man nun 0,1 Skalenteile von dem bei dieser Stellung abgelesenen Wert *abziehen*, um jenen Wert zu erhalten, der einer Einstellung auf die Mitte des Teilstriches entspricht. Zum Beispiel Serum (Mensch):

	Skalenteile	n_D
Einstellung auf den nächstniederen Teilstrich 56		
(Teilstrich im *hellen* Feld)	56,85 + 0,1 = 56,95	1,34908
Einstellung auf den nächsthöheren Teilstrich 57		
(Teilstrich im *dunklen* Feld)	57,15 — 0,1 = 57,05	1,34910

[1]) Siehe die einzelnen Ablesungsreihen der Fehlerversuche S. 427, Tabelle V und S. 430, Tabelle VII.

[2]) Siehe S. 432, Tabelle X.

Tabelle III.

	Temperatur in °C	Skalenteile	n_D***)	$\Delta\, n_D$
destill. Wasser*)	+ 17	15,1	1,33324	
				− 0,00004
	+ 17,5	15,0	1,33320	
				− 0,00004
	+ 18	14,9	1,33316	
Serum (Mensch)**)	+ 17,0 ± 0,03	52,67 ± 0,02	1,34749	
				− 0,00002
	+ 17,5 ± 0,02	52,62 ± 0,02	1,34747	
				− 0,00002
	+ 18,0 ± 0,02	52,56 ± 0,02	1,34745	

*) Aus der dem Instrument beigegebenen Justiertabelle zusammengestellt.
**) Nach einem eigenen Versuch.
***) Beim Serum ist der n_D immer aus dem Mittelwert der bei 10 Ablesungen gefundenen Skalenteile berechnet.

davon überzeugen, ob die abgelesenen Werte noch einen Gang haben, doch ist es bequemer, ein für allemal das Minimum der Temperierdauer[1]) zu kennen, bei dessen Überschreiten man sicher sein kann, keinen durch zu frühes Ablesen verursachten Fehler zu begehen.

Es frug sich also erstens: Wie lange *muß* man temperieren? Zweitens durfte nicht die Möglichkeit vergessen werden, daß bei zu langer Temperierzeit etwas von der zwischen den Prismen befindlichen Flüssigkeit in den relativ großen Raum innerhalb der Metallhülse verdunsten konnte; da sich dies wegen der Kleinheit des verwendeten Tropfens beim Untersuchen von Lösungen sehr bald bemerkbar machen konnte, mußte man auch fragen: Wie lange *darf* man temperieren?

In den folgenden zur Ermittlung der Temperierzeit angestellten Versuchen habe ich bei dem Reinigen und Beschicken des Refraktometers die gleichen zeitlichen Verhältnisse eingehalten, wie sie sich ergeben, wenn man mehrere Untersuchungen unmittelbar nacheinander vornimmt[2]), denn es hatte sich herausgestellt, daß die seit der Reinigung der Prismen verflossene Zeit von Einfluß auf die Temperierdauer ist. Tabelle IV gibt 4 solche Versuche wieder, die wie folgt ausgeführt sind:

Ausgangslage: Refraktometer beschickt im Temperierbad.

Versuch: Refraktometer aus dem Bad herausgenommen, wie gewöhnlich gereinigt durch Abspülen mit destilliertem Wasser von Zimmertemperatur und vorsichtigem Trockenwischen mit einem Leinenläppchen. Hierauf mit 0,05 ccm Flüssigkeit beschickt und wieder in das Temperierbad eingebracht. Zeit vom Herausnehmen des Instrumentes bis zum Wiedereinbringen in das Temperierbad: 6 Minuten. Zimmertemperatur bis + 20° C.

Die in Tabelle IV eingetragenen Zahlen sind bis zur 30. Minute Mittelwerte aus 3, die folgenden aus 5 Ablesungen.

Man sieht aus den angeführten Versuchen, daß die abgelesenen Werte im Anfang einen Gang haben, dessen Sinn einem Absinken der Temperatur entspricht. Die Prismen sind also anfangs wärmer als das Temperierbad, und zwar auch dann, wenn die Zimmertemperatur unter + 17,5° C ist, was nur von der Erwärmung der

[1]) Vom Einbringen des Instrumentes in das Temperierbad an gerechnet.
[2]) Vgl. S. 457, die „Zeiteinteilung".

Tabelle IV.

	Beschickt mit:	destill. Wasser	physiol. Kochsalzlösung	Serum (Kaninchen)	Serum (Mensch)
	Zimmertemperatur:	+ 19	+ 16	+ 15	+ 19° C
	Minuten nach der Beschickung	Skalenteile			
	1	14.60	18,92	50,68	55.10
	2	14,73	18,98	50,72	55,58
	4	14.92	19.07	50.91	56.10
	6	15.01	19,16	50.93	56.50
	8	15.08	19,19	50,98	56,70
	10	15,14	19.21	51,00	56,81
	12	15.17	19.23	51,01	56.90
	14	15,18	19,24	51,00	56,93
	16	15,19	19,26	51,00	56.95
Temperierzeit	18	15.19	19.27	51,01	56,99
Temperierzeit	**20**	**15,20**	**19,25**	**51,08**	**57,01**
Temperierzeit	22	15.20	19,26	51,01	57,00
	24	15.20	19,27	51,02	57,02
	26	15.21	19,26	51,01	57.01
	28	15,19	19,26	51,03	57,00
	30	15,21	19,27	51,02	57,02
	35	15,20	19,27	51,02	57,02
	40	15.20	—	51,02	57,04
	45	—	19,29	51,03	57,05
	60	-	19,30	51,03	57.08
	120	-	19,38	51,09	—
	240	-	—	—	57,32

Prismen durch das Trockenwischen herrühren kann[1]). Dann folgen nach durchschnittlich 16 Minuten[2]) gangfreie Werte. Erst viel später (frühestens nach 35 Minuten) macht sich die Verdunstung durch neuerliches, aber viel langsameres Ansteigen der Ablesungswerte bemerkbar. Berücksichtigt man, daß bei Zimmertemperaturen bis + 20° C die Temperierdauer des letzten Versuches die größte je beobachtete war, so empfiehlt sich die Einhaltung einer *Temperierzeit von* 20 *Minuten*.

Nur ganz ausnahmsweise, bei viel höherer Zimmertemperatur kam es vor, daß dies nicht ausreichte. Man kann sich dann durch Vornahme der Reinigung mit gekühltem Wasser helfen; immerhin ist in solchen Fällen eine Kontrolle an den abgelesenen Werten selbst notwendig, da das *nach* dem Abspülen der Prismen unvermeidliche Trockenwischen sich trotz aller Vorsicht nicht genügend abstufen läßt und die Abkürzung der Temperierdauer nicht mit Sicherheit in der gewünschten Weise gelingt.

Zusammengefaßt ergibt sich also aus der Diskussion der Fehlerquellen der n_D *Bestimmung hauptsächlich folgendes*:

Ein bis auf ± 0,1° C *konstant erhaltenes Temperierbad genügt den zu stellenden*

[1]) Die Beschickungsflüssigkeit selbst kann wegen ihrer geringen Menge keine Rolle spielen.

[2]) Der Durchschnitt ist aus 15 analogen Versuchen entnommen, die bei Zimmer-Temperaturen bis + 20° C gemacht sind und in denen die Temperierdauer Werte zwischen minimal 8, maximal 20 Minuten betrug.

Anforderungen; die Temperierzeit soll im allgemeinen mit 20 Minuten bemessen werden. Durch Einführung der unter 5 geschilderten Ablesungsart läßt sich die Genauigkeit des Ablesens steigern.

Für die Untersuchung von Serum ergibt sich im besonderen, daß die Spiegel- und Blendenstellung von Einfluß auf das Meßergebnis sein kann, in welchem Falle nur solche Brechungsindices eines Serums verglichen werden dürfen, die bei unveränderter Spiegel- und Blendenstellung gemessen sind.

C. Fehler der n_D-Bestimmung.

Wenn man die Genauigkeit einer Meßmethode ermitteln will, nimmt man eine größere Anzahl von Messungen des gleichen Objektes vor und kann dann aus den Abweichungen der einzelnen Resultate vom arithmetischen Mittel aller die „Fehler“, mit denen man bei der Anwendung der Methode zu rechnen haben wird, in bekannter Weise ableiten. Um diese nun für die n_D-Bestimmung der bei den Fermentversuchen vorkommenden Flüssigkeiten und für jene Ausführungsart der Methode, wie sie sich aus der vorangegangenen Besprechung der Fehlerquellen ergibt, kennenzulernen, habe ich die folgenden Fehlerversuche gemacht, die ich als Beleg für die Genauigkeit des Verfahrens ausführlich mitteile:

Tabelle V.

Beschickung	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		IX		X	
Kompensator	Erste Einstellung nicht geändert									Vor jeder Ablesungsreihe ganz neu eingestellt, und zwar Spiegel und Blende bei 1 und 2 absichtlich verschieden.										
Spiegel und Blende	Erste Einstellung nicht geändert							Geändert	Geändert											
Ablesungsreihe	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Abgelesene Skalenteile (die Hundertel geschätzt)	19,45	19,44	19,35	19,40	19,44	19,45	19,39	19,40	19,42	19,41	19,42	19,42	19,46	19,46	19,45	19,46	19,39	19,45	19,39	19,43
	19,46	19,45	19,38	19,38	19,46	19,47	19,40	19,39	19,44	19,42	19,41	19,41	19,47	19,45	19,45	19,47	19,40	19,46	19,38	19,48
	19,45	19,45	19,38	19,39	19,47	19,47	19,39	19,38	19,44	19,42	19,40	19,41	19,48	19,44	19,44	19,46	19,40	19,45	19,38	19,46
	19,43	19,48	19,35	19,40	19,44	19,44	19,41	19,38	19,44	19,43	19,41	19,42	19,46	19,45	19,47	19,49	19,39	19,47	19,39	19,43
	19,43	19,43	19,37	19,38	19,44	19,44	19,38	19,41	19,43	19,42	19.42	19,41	19,48	19,45	19,45	19,48	19,40	19,44	19,40	19,46
	19,43	19,43	19,36	19,40	19,43	19,44	19,40	19,41	19,43	19,40	19,42	19,42	19,47	19,45	19,48	19,46	19,39	19,46	19,40	19,44
	19,44	19,45	19,38	19,38	19,44	19,46	19,38	19,40	19,42	19,42	19,42	19,41	19,48	19,44	19,45	19,48	19,40	19,45	19,39	19,44
	19,45	19,46	19,35	19,40	19,43	19,44	19,38	19,41	19,43	19,42	19,42	19,43	19,47	19,45	19,46	19,46	19,41	19,47	19,39	19,45
	19,44	19,43	19,37	19,39	19,47	19,47	19,41	19,38	19,42	19,42	19,43	19,42	19,48	19,46	19,47	19,48	19,39	19,46	19,38	19,43
	19,43	19,44	19,38	19,39	19,44	19,43	19,39	19,40	19,42	19,40	19,42	19,41	19,48	19,47	19,47	19,47	19,39	19,47	19,40	19,44
Summe	194,41	194,46	193,67	193,91	194,46	194,51	193,93	193,96	194,29	194,16	194,17	194,16	194,73	194,52	194,59	194,71	193,96	194,58	193,90	194,41
Arith. Mittel	19,44	19,45	19,37	19,39	19,45	19,45	19,39	19,40	19,43	19,42	19,42	19,42	19,47	19,45	19,46	19,47	19,40	19,46	19,39	19,44
n_D	1,83491	1,38491	1,83488	1,83489	1,83491	1,83491	1,83489	1,83490	1,83491	1,83490	1,83490	1,83490	1,83492	1,83491	1,83492	1,83492	1,83490	1,83492	1,83489	1,83491

Tabelle IV.

Beschickt mit:	destill. Wasser	physiol. Kochsalzlösung	Serum (Kaninchen)	Serum (Mensch)
Zimmertemperatur:	+ 19	+ 16	+ 15	+ 19° C
Minuten nach der Beschickung	Skalenteile			
1	14,60	18,92	50,68	55,10
2	14,73	18,98	50,72	55,58
4	14,92	19,07	50,91	56,10
6	15,01	19,16	50,93	56,50
8	15,08	19,19	50,98	56,70
10	15,14	19,21	51,00	56,81
12	15,17	19,23	51,01	56,90
14	15,18	19,24	51,00	56,93
16	15,19	19,26	51,00	56,95
18	15,19	19,27	51,01	56,99
Temperierzeit **20**	**15,20**	**19,25**	**51,08**	**57,01**
22	15,20	19,26	51,01	57,00
24	15,20	19,27	51,02	57,02
26	15,21	19,26	51,01	57,01
28	15,19	19,26	51,03	57,00
30	15,21	19,27	51,02	57,02
35	15,20	19,27	51,02	57,02
40	15,20	—	51,02	57,04
45	—	19,29	51,03	57,05
60	—	19,30	51,03	57,08
120	—	19,38	51,09	—
240	—	—	—	57,32

Prismen durch das Trockenwischen herrühren kann[1]). Dann folgen nach durchschnittlich 16 Minuten[2]) gangfreie Werte. Erst viel später (frühestens nach 35 Minuten) macht sich die Verdunstung durch neuerliches, aber viel langsameres Ansteigen der Ablesungswerte bemerkbar. Berücksichtigt man, daß bei Zimmertemperaturen bis + 20° C die Temperierdauer des letzten Versuches die größte je beobachtete war, so empfiehlt sich die Einhaltung einer ***Temperierzeit von* 20 *Minuten*.**

Nur ganz ausnahmsweise, bei viel höherer Zimmertemperatur kam es vor, daß dies nicht ausreichte. Man kann sich dann durch Vornahme der Reinigung mit gekühltem Wasser helfen; immerhin ist in solchen Fällen eine Kontrolle an den abgelesenen Werten selbst notwendig, da das *nach* dem Abspülen der Prismen unvermeidliche Trockenwischen sich trotz aller Vorsicht nicht genügend abstufen läßt und die Abkürzung der Temperierdauer nicht mit Sicherheit in der gewünschten Weise gelingt.

Zusammengefaßt ergibt sich also aus der Diskussion der Fehlerquellen der n_D *Bestimmung hauptsächlich folgendes:*

Ein bis auf ± 0,1° C *konstant erhaltenes Temperierbad genügt den zu stellenden*

[1]) Die Beschickungsflüssigkeit selbst kann wegen ihrer geringen Menge keine Rolle spielen.

[2]) Der Durchschnitt ist aus 15 analogen Versuchen entnommen, die bei Zimmer-Temperaturen bis + 20° C gemacht sind und in denen die Temperierdauer Werte zwischen minimal 8, maximal 20 Minuten betrug.

Anforderungen; die Temperierzeit soll im allgemeinen mit 20 Minuten bemessen werden. Durch Einführung der unter 5 geschilderten Ablesungsart läßt sich die Genauigkeit des Ablesens steigern.

Für die Untersuchung von Serum ergibt sich im besonderen, daß die Spiegel- und Blendenstellung von Einfluß auf das Meßergebnis sein kann, in welchem Falle nur solche Brechungsindices eines Serums verglichen werden dürfen, die bei unveränderter Spiegel- und Blendenstellung gemessen sind.

C. Fehler der n_D-Bestimmung.

Wenn man die Genauigkeit einer Meßmethode ermitteln will, nimmt man eine größere Anzahl von Messungen des gleichen Objektes vor und kann dann aus den Abweichungen der einzelnen Resultate vom arithmetischen Mittel aller die „Fehler", mit denen man bei der Anwendung der Methode zu rechnen haben wird, in bekannter Weise ableiten. Um diese nun für die n_D-Bestimmung der bei den Fermentversuchen vorkommenden Flüssigkeiten und für jene Ausführungsart der Methode, wie sie sich aus der vorangegangenen Besprechung der Fehlerquellen ergibt, kennenzulernen, habe ich die folgenden Fehlerversuche gemacht, die ich als Beleg für die Genauigkeit des Verfahrens ausführlich mitteile:

Tabelle V.

Beschickung	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		IX		X	
Kompensator	Erste Einstellung nicht geändert										Vor jeder Ablesungsreihe ganz neu eingestellt, und zwar Spiegel und Blende bei 1 und 2 absichtlich verschieden.									
Spiegel und Blende	Erste Einstellung nicht geändert							Geändert	Geändert											
Ablesungsreihe	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Abgelesene Skalenteile (die Hundertel geschätzt)	19,45	19,44	19,35	19,40	19,44	19,45	19,39	19,40	19,42	19,41	19,42	19,42	19,46	19,46	19,45	19,46	19,39	19,45	19,39	19,43
	19,46	19,45	19,38	19,38	19,46	19,47	19,40	19,39	19,44	19,42	19,41	19,41	19,47	19,45	19,45	19,47	19,40	19,46	19,38	19,43
	19,45	19,45	19,38	19,39	19,47	19,47	19,39	19,38	19,44	19,42	19,40	19,41	19,48	19,44	19,44	19,46	19,40	19,45	19,38	19,46
	19,43	19,48	19,35	19,40	19,44	19,44	19,41	19,38	19,44	19,43	19,41	19,42	19,46	19,45	19,47	19,49	19,39	19,47	19,39	19,43
	19,43	19,43	19,37	19,38	19,44	19,44	19,38	19,41	19,43	19,42	19,42	19,41	19,48	19,45	19,45	19,48	19,40	19,44	19,40	19,46
	19,43	19,43	19,36	19,40	19,43	19,44	19,40	19,41	19,43	19,40	19,42	19,42	19,47	19,45	19,48	19,46	19,39	19,46	19,40	19,44
	19,44	19,45	19,38	19,38	19,44	19,46	19,38	19,40	19,42	19,42	19,42	19,41	19,48	19,44	19,45	19,48	19,40	19,45	19,39	19,44
	19,45	19,46	19,35	19,40	19,43	19,44	19,38	19,41	19,43	19,42	19,42	19,43	19,47	19,45	19,46	19,46	19,41	19,47	19,39	19,45
	19,44	19,43	19,37	19,39	19,47	19,47	19,41	19,38	19,42	19,42	19,43	19,42	19,48	19,46	19,47	19,48	19,39	19,46	19,38	19,43
	19,43	19,44	19,38	19,39	19,44	19,43	19,39	19,40	19,42	19,40	19,42	19,41	19,48	19,47	19,47	19,47	19,39	19,47	19,40	19,44
Summe	194,41	194,46	193,67	193,91	194,46	194,51	193,93	193,96	194,29	194,16	194,17	194,16	194,73	194,52	194,59	194,71	193,96	194,58	193,90	194,41
Arith. Mittel	19,44	19,45	19,37	19,39	19,45	19,45	19,39	19,40	19,43	19,42	19,42	19,42	19,47	19,45	19,46	19,47	19,40	19,46	19,39	19,44
n_D	1,33491	1,33491	1,33488	1,33489	1,33491	1,33491	1,33489	1,33490	1,33491	1,33490	1,33490	1,33490	1,33492	1,33491	1,33492	1,33492	1,33490	1,33492	1,33489	1,33491

Fehlerversuch mit physiologischer (ca. 0,86 proz.) Kochsalzlösung:

Refraktometer Nr. 13 808.
Hilfsprisma mit kleinem Ausschliff und Haltestoppel.
Lichtquelle: 100 kerzige Osramlampe bei 35 cm Abstand des Glühringes vom Beleuchtungsspiegel.
Beschickungsmenge: 0,04 ccm.
Temperatur des Temperierbades: +17,5 ± 0,05° C.
Zimmertemperatur: +19° C.
Temperierzeit: 20 Minuten. (Alle Ablesungen vor der 30. Minute.)
Anzahl der Beschickungen: 10.
Stellung des Kompensators, des Spiegels und der Blende anfänglich beibehalten, später vor jeder Ablesungsreihe geändert (siehe Tabelle V).
Von jeder Beschickung 2 Ablesungsreihen zu 10 Ablesungen gemacht, die erste nach Ablauf der Temperierzeit, die zweite 5 Minuten später.
Vor jeder Neubeschickung Reinigung des Instrumentes.

An dem guten Übereinstimmen der abgelesenen Skalenteile in den einzelnen Ablesungsreihen sieht man zunächst, wie sehr sich die Genauigkeit des Ablesens durch die unter Punkt 5 beschriebene Einstellungsart steigern läßt. Wenn man die bei verschiedenen Beschickungen abgelesenen Zahlen vergleicht, so fällt es auf, daß sie im allgemeinen weniger gut übereinstimmen als die Ablesungen bei einer Beschickung untereinander; es muß also beim Beschicken irgendein Umstand[1]) größere Abweichungen bedingen können, mit dem vielleicht auch die ausnahmsweise zwischen den Ablesungen bei der gleichen Beschickung beobachteten größeren Differenzen zusammenhängen (siehe solche Abweichungen bei Beschickung IX und X).

Der Versuch zeigt ferner, daß das Neueinstellen von Kompensator, Spiegel und Blende ohne merklichen Einfluß auf das Meßergebnis ist. [Übereinstimmen der bei ungeänderter und wechselnder Einstellung vorgenommenen Messungen in denselben Grenzen[2]).] Man ist daher berechtigt, den n_D-Bestimmungen der ersten und der zweiten Hälfte des Versuches für die Fehlerrechnung gleiches Gewicht[3]) zuzusprechen.

Der Fehlerrechnung sind die in Tabelle VI zusammengestellten 10 n_D-Bestimmungen zugrunde gelegt, die der ersten Ablesungsreihe jeder Beschickung ent-

Tabelle VI.

Beschickung		n_D	Δ	Δ^2
I	1. Ablesungsreihe	1,33491	$+1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-10}$
II		1,33488	$-2 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-10}$
III		1,33491	$+1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-10}$
IV		1,33489	$-1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-10}$
V		1,33491	$+1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-10}$
VI		1,33490	$0 \cdot 10^{-5}$	$0 \cdot 10^{-10}$
VII		1,33492	$+2 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-10}$
VIII		1,33492	$+2 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-10}$
IX		1,33490	$0 \cdot 10^{-5}$	$0 \cdot 10^{-10}$
X		1,33489	$-1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-10}$
Summe		13,34903		**S. = 17 · 10^{-10}**
Mittelwert		**1,33490**		

[1]) Vielleicht ungleiche Lage des Hilfsprismas.
[2]) Vgl. S. 421 den Hinweis auf diesen Versuch.
[3]) „Gewicht" einer Messung nennt man den Grad ihrer Zuverlässigkeit.

sprechen, und zwar deshalb nur diese, weil die einzelne Bestimmung des Fehlerversuches dasselbe Gewicht haben sollte wie die Bestimmungen bei der Anwendung der Methode, wo ich auch immer den Mittelwert aus 10 Ablesungen zur Berechnung des Brechungsindex benütze.

Aus der Δ-Spalte der Tabelle ersieht man, daß die Werte der einzelnen Bestimmungen um höchstens 2 Einheiten der 5. Dezimale vom Mittelwert abweichen, ihre Fehlergrenze also mit $\pm$ 0,00002 anzusetzen ist. Setzt man nun die Summe der Fehlerquadrate (S) und die Anzahl (n) der Bestimmungen in die bekannten Formeln der Fehlerrechnung ein, so ergibt sich als mittlerer Fehler des Mittelwertes:

$$E = \pm\sqrt{\frac{S}{n(n-1)}} = \pm 0{,}43 \cdot 10^{-5} = \pm 0{,}0000043$$

als wahrscheinlicher Fehler des Mittelwertes:

$$E_w = 0{,}674 \cdot E = \pm 0{,}29 \cdot 10^{-5} = \pm 0{,}0000029 \, .$$

Der Mittelwert ist somit noch in der 5. Dezimale sicher, so daß also die Zahl der der Fehlerrechnung zugrunde gelegten Bestimmungen ausreichend war zur Bildung eines für unsere Zwecke brauchbaren Mittelwertes.

Ferner ergibt sich als mittlerer Fehler einer Bestimmung:

$$e = \pm\sqrt{\frac{S}{n-1}} = \pm 1{,}37 \cdot 10^{-5} = \pm 0{,}0000137$$

und als wahrscheinlicher Fehler einer Bestimmung:

$$e_w = 0{,}674 \cdot e = \pm 0{,}92 \cdot 10^{-5} = \pm 0{,}0000092 \, .$$

Fehlerversuch mit einem „schlecht ablesbaren" Serum[1]) (Mensch), d. h. mit einem Serum, bei dem es nur bei ganz bestimmten Spiegel- und Blendenstellungen gelang, eine deutliche Grenzlinie zu bekommen:

Refraktometer: Nr. 13 808.
Hilfsprisma mit kleinem Ausschliff und Haltestoppel.
Lichtquelle wie früher.
Beschickungsmenge: 0,04 ccm.
Temperatur des Temperierbades: +17,5 $\pm$0,05° C.
Zimmertemperatur: +17° C.
Temperierzeit: 20 Minuten (alle Ablesungen vor der 30. Minute).
Anzahl der Beschickungen: 10.
Stellung des Kompensators, des Spiegels und der Blende während des ganzen Versuches nicht geändert.
Von jeder Beschickung 2 Ablesungsreihen zu 10 Ablesungen gemacht, die erste nach Ablauf der Temperierzeit, die zweite 5 Minuten später.
Vor jeder Neubeschickung Reinigung des Instrumentes.

Auch bei diesem Versuch (Tab. VII) mit einem „schlecht ablesbaren" Serum ist die Genauigkeit des Ablesens — wie man an den einzelnen Ablesungsreihen erkennt — bei Berücksichtigung der Teilstrichbreite immer noch eine viel größere, als man sie sonst angegeben findet. Noch deutlicher als früher sieht man in dem Versuch, daß die bei verschiedenen Beschickungen abgelesenen Werte weniger gut übereinstimmen, als die Ablesungen einer Beschickung untereinander. Der Fehlerrechnung sind wieder die aus der ersten Ablesungsreihe jeder Beschickung gewonnenen Mittelwerte zugrunde gelegt (Tab. VIII).

---

[1]) Für die wiederholte Beschaffung von Normalblutproben bin ich den Herren Prof. Dr. *E. Streissler* und Dr. *F. Ascher* der Grazer Chirurgischen Universitätsklinik zu Dank verpflichtet.

Tabelle VII.

Beschickung	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		IX		X	
Ablesungsreihe	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Abgelesene Skalenteile (die Hundertel geschätzt)	61,33	61,34	61,41	61,40	61,42	61,42	61,15	61,16	61,35	61,31	61,16	61,16	61,22	61,23	61,14	61,16	61,30	61,28	61,22	61,22
	61,33	61,33	61,41	61,41	61,42	61,41	61,13	61,18	61,32	61,32	61,18	61,13	61,21	61,23	61,15	61,18	61,30	61,28	61,21	61,23
	61,35	61,34	61,40	61,42	61,40	61,42	61,17	61,16	61,30	61,33	61,16	61,18	61,22	61,25	61,18	61,18	61,26	61,30	61,20	61,22
	61,33	61,32	61,42	61,43	61,41	61,42	61,18	61,16	61,33	61,31	61,16	61,13	61,19	61,23	61,14	61,13	61,29	61,29	61,22	61,20
	61,37	61,34	61,41	61,42	61,41	61,40	61,15	61,18	61,31	61,32	61,14	61,14	61,23	61,22	61,15	61,15	61,28	61,27	61,22	61,26
	61,35	61,32	61,41	61,42	61,39	61,40	61,18	61,18	61,31	61,32	61,13	61,17	61,20	61,22	61,16	61,16	61,30	61,25	61,23	61,23
	61,33	61,33	61,46	61,47	61,42	61,43	61,18	61,16	61,33	61,33	61,19	61,16	61,22	61,22	61,16	61,15	61,29	61,29	61,23	61,20
	61,32	61,32	61,40	61,43	61,42	61,43	61,18	61,17	61,32	61,29	61,17	61,17	61,22	61,25	61,18	61,14	61,31	61,28	61,24	61,23
	61,33	61,33	61,42	61,42	61,41	61,42	61,12	61,17	61,32	61,33	61,17	61,18	61,21	61,21	61,18	61,16	61,26	61,27	61,23	61,19
	61,33	61,34	61,41	61,47	61,43	61,42	61,17	61,18	61,32	61,33	61,18	61,17	61,21	61,22	61,18	61,17	61,26	61,30	61,21	61,22
Summe	613,37	613,31	614,15	614,29	614,18	614,17	611,61	611,70	613,21	613,19	611,59	611,59	612,13	612,28	611,57	611,58	612,85	612,81	612,21	612,20
Arith. Mittel	61,34	61,33	61,41	61,43	61,41	61,42	61,16	61,17	61,32	61,32	61,16	61,16	61,21	61,23	61,16	61,16	61,28	61,28	61,22	61,22
n_D	1,35071	1,35070	1,35073	1,35074	1,35078	1,35078	1,35064	1,35064	1,35070	1,35070	1,35064	1,35064	1,35066	1,35066	1,35064	1,35064	1,35068	1,35068	1,35066	1,35066

Wie man aus der Tabelle VIII ersieht, wird man entsprechend der größten Abweichung vom Mittelwert die Fehlergrenze mit $\pm 0{,}00005$ anzusetzen haben. Die Berechnung ergibt:

mittlerer Fehler des Mittelwertes:

$$E = \pm 1{,}15 \cdot 10^{-5} = \pm 0{,}0000115\,;$$

wahrscheinlicher Fehler des Mittelwertes:

$$E_w = \pm 0{,}77 \cdot 10^{-5} = \pm 0{,}0000077\,;$$

mittlerer Fehler einer Bestimmung:

$$e = \pm 3{,}64 \cdot 10^{-5} = \pm 0{,}0000364\,;$$

wahrscheinlicher Fehler einer Bestimmung:

$$e_w = \pm 2{,}45 \cdot 10^{-5} = \pm 0{,}0000245\,.$$

Tabelle VIII.

Beschickung		n_D	Δ	Δ^2
I	1. Ablesungsreihe	1,35071	$+3 \cdot 10^{-5}$	$9 \cdot 10^{-10}$
II		1,35073	$+5 \cdot 10^{-5}$	$25 \cdot 10^{-10}$
III		1,35073	$+5 \cdot 10^{-5}$	$25 \cdot 10^{-10}$
IV		1,35064	$-4 \cdot 10^{-5}$	$16 \cdot 10^{-10}$
V		1,35070	$+2 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-10}$
VI		1,35064	$-4 \cdot 10^{-5}$	$16 \cdot 10^{-10}$
VII		1,35066	$-2 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-10}$
VIII		1,35064	$-4 \cdot 10^{-5}$	$16 \cdot 10^{-10}$
IX		1,35068	$0 \cdot 10^{-5}$	$0 \cdot 10^{-10}$
X		1,35066	$-2 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-10}$
	Summe	13,50679		S. = **119** $\cdot 10^{-10}$
	Mittelwert	**1,35068**		

Endlich sei in der folgenden Tabelle noch ein ganz analoger Fehlerversuch mit einem gut ablesbaren Serum auszugsweise wiedergegeben:

Tabelle IX.

Beschickung		Ablesungsreihe	Skalateile (Mittelwerte aus je 10 Ablesungen)	n_D
Bei unveränderter Spiegel- und Blendenstellung	I	1	53,82	1,34791
		2	53,84	1,34792
	II	1	53,82	1,34791
		2	53,80	1,34791
	III	1	53,85	1,34792
		2	53,86	1,34793
	IV	1	53,78	1,34790
		2	53,79	1,34790
	V	1	53,82	1,34791
		2	53,84	1,34792
	VI	1	53,74	1,34788
		2	53,73	1,34788
	VII	1	53,81	1,34791
		2	53,80	1,34791
	VIII	1	53,79	1,34790
		2	53,80	1,34791
	IX	1	53,83	1,34792
		2	53,85	1,34792
	X	1	53,82	1,34791
		2	53,82	1,34791
Spiegel und Blende jedesmal neu eingestellt		3	54,00	1,34798
		4	53,72	1,34788
		5	54,06	1,34800
		6	53,64	1,34785

Um zu zeigen, was für einen Einfluß die Spiegel- und Blendenstellung auch bei einem so gut ablesbaren Serum haben kann, sind an die bei unveränderter Spiegel- und Blendenstellung ausgeführten n_D-Bestimmungen des Fehlerversuches bei der X. Beschickung noch 4 weitere Bestimmungen mit jedesmal geänderter Spiegel- und Blendenstellung angeschlossen (in der Tabelle eingerahmt); man sieht, um wieviel die Schwankungsbreite dieser Bestimmungen $X/_3$ bis $X/_6$ die der vorhergehenden übertrifft.

Die wie bisher auf Grund der Mittelwerte aus der ersten Ablesungsreihe jeder Beschickung angesetzte Rechnung ergibt für den vorliegenden Versuch folgende Fehlerwerte:

mittlerer Fehler des Mittelwertes: $e = \pm 0{,}38 \cdot 10^{-5} = \pm 0{,}0000038$;
wahrscheinlicher Fehler des Mittelwertes: $e_w = \pm 0{,}26 \cdot 10^{-5} = \pm 0{,}0000026$;
mittlerer Fehler einer Bestimmung: $e = \pm 1{,}20 \cdot 10^{-5} = \pm 0{,}0000120$;
wahrscheinlicher Fehler einer Bestimmung: $e_w = \pm 0{,}81 \cdot 10^{-5} = \pm 0{,}0000081$.

Dies zeigt, daß die Fehler bei der n_D-Bestimmung eines „gut ablesbaren" Serums von der gleichen Größenordnung sind, wie bei der Kochsalzlösung. Es ist aber zu bemerken, daß die in meinen Fehlerversuchen für die n_D-Bestimmung von Serum gefundene Sicherheit nicht etwa für die Ermittlung des wirklichen Brechungsvermögens eines Serums gilt; sie gilt nur für den *Vergleichswert* einer bei bestimmter Spiegel- und Blendenstellung vorgenommenen n_D-Bestimmung.

Auf Grund der Fehlerversuche läßt sich nun angeben[1]), mit welchen Fehlern die n_D-Bestimmungen in den folgenden Fermentversuchen behaftet sind bzw. mit welcher Genauigkeit man bei der Anwendung zu rechnen haben wird. Und zwar kommen für die Anwendung die im Fehlerversuch für die Fehler der ***einzelnen Bestimmung*** ermittelten Werte in Betracht, da eine solche das gleiche Gewicht hat wie eine n_D-Bestimmung, die unter den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Bedingungen ausgeführt ist.

Zusammengefaßt ergeben sich also folgende Fehler für eine solche n_D***-Bestimmung:***

Tabelle X.

	Einer verdünnten Salzlösung	Eines Serums bei bestimmter Spiegel- und Blendenstellung
Fehlergrenze	$\pm$ 0,00002	bis + 0.00005
Mittlerer Fehler	+ 0.0000137	„ + 0,0000364
Wahrscheinlicher Fehler	+ 0,0000092	„ + 0,0000245

Ib. Der Fermentversuch.

Da es sich beim Fermentversuch darum handelt, aus der beobachteten Änderung des Brechungsindex des flüssigen Anteiles des Reaktionssystems auf eine fermentative Lösung des Substrates zu schließen, kommen vor allem jene Umstände als Fehlerquellen in Betracht, durch die andere als durch die fermentative Auflösung des Substrates bedingte n_D-Änderungen verursacht werden können; ferner werden, wenn die Methode quantitativen Zwecken dienstbar gemacht werden soll, alle Faktoren zu berücksichtigen sein, von denen die Abbaugröße abhängt.

In die erste Gruppe gehören folgende Fehlermöglichkeiten:

1. Abgabe löslicher Bestandteile seitens der Versuchsgefäße.
2. Verdunstung des Lösungsmittels während des Versuches.
3. Spontane Löslichkeit der Substrate.
4. Die mit der Quellung des Substrates und
5. mit der Verwendung gequollener Substrate zusammenhängenden Fehlerquellen.
6. Durch Zustandsänderungen des flüssigen Anteiles des Reaktionssystems und
7. durch Bakterienwachstum verursachte n_D- bzw. Konzentrationsänderungen.

Es folgen die Faktoren, von denen die Größe der Ausschläge, insbesondere die Abbaugröße abhängt bzw. abhängen kann und von denen zu entscheiden sein wird, innerhalb welcher Grenzen sie konstant erhalten werden müssen, um ohne Einfluß auf das Versuchsergebnis zu bleiben:

8. Abbaufähigkeit des Substrates.
9. Substratmenge.
10. Korngröße des Substrates.
11. Verschiedenheiten im Quellungszustand des Substrates.
12. Menge des flüssigen Anteils des Systems.
13. Beschaffenheit des Mediums.
14. Fermentkonzentration und Aktivität.
15. Zustand der Fermentlösung.
16. Temperatur.
17. Zeit.
18. Mischungsbedingungen.

[1]) Mit dem Refraktometer Nr. 13 807 angestellte Fehlerversuche ergaben Fehler der gleichen Größenordnung.

1. und 2. Abgabe löslicher Bestandteile seitens der Versuchsgefäße und Verdunstung des Lösungsmittels.

Diese beiden erstgenannten Fehlermöglichkeiten mußten sich durch die Wahl geeigneter Versuchsgefäße ausschließen lassen. Als solche benützte ich von *H. Pfeiffer* zu diesem Zweck angegebene zylindrische Gläschen von ungefähr 1,5 ccm Fassungsraum mit eingeschliffenem Glasstoppel. Da es nicht möglich war, die Gläschen aus Jenaer Hartglas zu beschaffen, verwendete ich solche aus gewöhnlichem Glas.

Um die leichter löslichen Glasbestandteile möglichst zu entfernen, wurden die Gläschen nach gründlicher Reinigung mindestens eine halbe Stunde lang mit strömendem Wasserdampf behandelt [wie dies *Wi. Ostwald*, empfiehlt[1])] und sie haben dann ausnahmslos die erste der unten beschriebenen Proben bestanden (Prüfung a).

Im übrigen geschah die Reinhaltung der Gläschen wie folgt:

Nach jedem Gebrauch gründliches Ausspülen mit einem scharfen Wasserstrahl zur mechanischen Entfernung möglichst aller Substratreste, hierauf Behandlung mit einer aus konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumpyrochromat bestehenden Oxydationsflüssigkeit. Dann werden die Gläschen über Nacht auf einen mit der Wasserleitung verbundenen Spülapparat gebracht, vor dem Gebrauch mit destilliertem Wasser nachgewaschen und eventuell mittels Luftpumpe getrocknet. Von Zeit zu Zeit wurde auch das Ausdämpfen wiederholt.

Auf die Herstellung dieses wirklich dichten Verschlusses mußte besondere Sorgfalt verwendet werden, da ein wenn auch geringfügiges Verdunsten des im allgemeinen nur 0,5 ccm betragenden Inhaltes eine relativ große Konzentrationszunahme verursachen und damit zu groben Fehlern führen konnte[2]). Die Verschlüsse schliff ich von Hand aus mit feinstem Karborundpulver ein und überzeugte mich dann durch die Prüfung b), ob die Gläschen den Anforderungen genügen.

L
S
S
M
H
F

Abb. 1.

Prüfung a) (auf störende Mengen löslicher Glasbestandteile): Beschicken der Gläschen mit destilliertem Wasser, dessen n_D nach 24stündigem Aufenthalt der Gläschen im Brutschrank (+ 37° C) keine Zunahme zeigen darf.

Prüfung b) (auf guten Verschluß): Beschicken mit 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung, deren n_D bei ebensolangem Brutschrankaufenthalt nicht zunehmen darf.

Da trotz ausschließlicher Verwendung von Gläschen, die diese Prüfung wiederholt bestanden hatten, gelegentlich Verdunstungsfehler — offenbar infolge Lockerung des Verschlusses — vorkamen, erwies sich folgende Vorsichtsmaßregel als nützlich: Die beschickten Gläschen werden, nachdem sie gut verschlossen sind, in einen Halter gesteckt, der ein Lockerwerden des Glasstoppels verhindert. Dieser Halter besteht (siehe Abb. 1) aus einer hölzernen, die Gläschen etwa bis zur halben Höhe aufnehmenden Hülse (*H*); das an den freien Enden der beiden Spiralfedern (*S*) angebrachte Lederläppchen (*L*) kann über den Stoppel des Gläschens gezogen

[1]) *Ostwald* und *Luther*, Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physiko-chemischer Messungen. III. Aufl., S. 469. Leipzig 1920.

[2]) Daß das Verdunsten in den Gasraum der Versuchsgläschen, die bis zur Erreichung der mit der Lösung im Gleichgewicht befindlichen Dampfspannung stattfinden mußte, keinen merklichen Fehler verursachen kann, zeigt eine Überschlagsrechnung.

werden und hält ihn so in seiner richtigen Lage fest. So armiert, werden die Gläschen in den Thermostaten gelegt oder, wenn der Versuch dies verlangt, mittels des am Halter befindlichen Fortsatzes (*F*) an den später beschriebenen Mischapparat befestigt. Wenn die Versuchstemperatur erheblich höher als die des Zimmers ist, wärme ich Gläschen und Systemflüssigkeit vor dem Beschicken auf die Versuchstemperatur vor, um das Entstehen eines Überdruckes im Innenraum des Gläschens zu verhindern. Um im einzelnen Falle sicher zu sein, daß keine Verdunstung stattgefunden habe, zeichne ich bei Versuchsbeginn den Stand der Flüssigkeit im Gläschen durch eine zarte Tinten- oder Tuschemarke (*M*) am Gläschen an.

Ich habe mich überzeugt, daß für die in meinen Versuchen angewendeten Flüssigkeitsmengen und Konzentrationen eine an der n_D-Zunahme eben merkliche Verdunstung auch am Nichtstimmen der Verdunstungsmarke deutlich zu erkennen ist, so daß das Stimmen der Marke als genügend sicheres Kriterium für den Ausschluß eines Verdunstungsfehlers genommen werden konnte.

3. *Spontane Löslichkeit des Substrates.*

Als Substrate verwendete ich nach den Angaben von *F. Pregl*[1]) hergestellte Trockenproteine und zwar im Hinblick auf die zunächst beabsichtigte Anwendung der Methode von verschiedenen menschlichen Organen und verschiedenen Seren[2]).

Von den Substraten ist zu verlangen, daß sie in den Lösungsmitteln, die im Fermentversuch angewendet werden, bei Abwesenheit des Fermentes praktisch unlöslich seien. Bevor man die Substrate in Gebrauch nimmt, muß daher ihre Löslichkeit geprüft werden, was ich in wiederholten eigens darauf gerichteten Versuchen unter verschiedenen, insbesondere auch unter solchen Bedingungen tat, wie sie bei den Fermentversuchen herrschen. Im folgenden sind die Versuche, die zur Prüfung einiger der von mir verwendeten Substrate dienten, sowie deren Ergebnisse (Tabelle XI) zusammengestellt:

geprüftes Präparat:	Bezeichnung:	hergestellt:	
Placenta-Trockenprotein I	Plac. I	*Pfeiffer*	1919
„ II	„ II	*Pregl*[3])	—
„ III[4])	„ III	*Kupelwieser*	1921
Trockenprotein aus Pferdeserum	Pf.-Ser.	*Pfeiffer*	1919
„ „ Rinderserum	R.-Ser.	*Pregl*[3])	1921

Diese Trockenproteine wurden folgenden Prüfungen unterworfen:

Versuch a) (*Prüfung des Kochwassers*):

Je 0,04 g Substrat mit 2 ccm destilliertem Wasser (das ist das gleiche Mengenverhältnis Substrat : Lösungsmittel wie im Fermentversuch) eine Stunde bei Zimmertemperatur (zum Quellen) stehenlassen, dann eine Minute lang *gekocht*; 30 Minuten später das Kochwasser vom Substrat abfiltriert und seinen n_D bestimmt. Differenz gebildet zwischen dem n_D des Kochwassers und dem vorher bestimmten n_D des reinen destillierten Wassers.

Ergebnis: Tabelle XI $\Delta_a = n_D$ (Kochwasser) — n_D (dest. Wasser).

Versuch b) (*Löslichkeit in heißem destilliertem Wasser bei längerer Versuchsdauer*):

[1]) *F. Pregl*, Fermentforschung **1**, 7. 1914.

[2]) Beschrieben von *L. Löhner*, Fermentforschung **5**, 41. 1921.

[3]) Herrn Prof. Dr. Dr. *F. Pregl* erlaube ich mir für die freundliche Überlassung der von ihm hergestellten Präparate an dieser Stelle zu danken.

[4]) Hier wurde das Auskochen am Schluß der Darstellung absichtlich nicht soweit getrieben wie gewöhnlich.

Versuchsgläschen mit je 0,01 g Substrat und 0,5 ccm siedendem destillierten Wasser beschickt; hierauf 30 Minuten am Wasserbad bei + 95° C gehalten und noch 6 Stunden bei Zimmertemperatur stehenlassen. Dann den n_D der Versuchsflüssigkeit bestimmt und wie früher mit dem von reinem destilliertem Wasser verglichen[1].

Ergebnis: Tabelle XI $\Delta_b = n_D - n_D$ (dest. Wasser).

Versuch c) (*Löslichkeit in kaltem destilliertem Wasser*):

Versuchsgläschen mit je 0,01 g Substrat und 0,5 ccm destilliertem Wasser von Zimmertemperatur beschickt; nach 2 Stunden n_D-Bestimmung der Versuchsflüssigkeit usw. wie *b*). Zimmertemperatur + 16° C.

Ergebnis: Tabelle XI $\Delta_c = n_D - n_D$ (dest. Wasser).

Versuch d) (*Löslichkeit in physiologischer Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur*):

Statt destilliertem Wasser ca. 0,86 proz. Kochsalzlösung als Lösungsmittel, sonst alles wie bei Versuch *c*). Der nach 24 Stunden bestimmte n_D der Versuchsflüssigkeit mit dem n_D des reinen Lösungsmittels verglichen. Zimmertemperatur + 14° C.

Ergebnis: Tabelle XI $\Delta_d = n_D - n_D$ (Lösungsmittel).

Versuch e) (*Löslichkeit in physiologischer Kochsalzlösung bei Bruttemperatur*):

Beschickungsmengen wie oben; Versuchsdauer 2 Std.; Temperatur + 37° C.

Ergebnis: Tabelle XI $\Delta_e = n_D - n_D$ (Lösungsmittel).

Versuch f) (*Löslichkeit in alkalischer ca. 0,86 proz. Kochsalzlösung*[2]) *bei Zimmertemperatur*):

Beschickungsmengen wie bisher; Versuchsdauer 24 Std.; Temperatur + 15° C.

Ergebnis: Tabelle XI $\Delta_f = n_D - n_D$ (Lösungsmittel).

Versuch g) (*Löslichkeit in schwach alkalischer ca. 0,86 proz. Kochsalzlösung bei Bruttemperatur*):

Beschickungsmengen usw. wie bisher; Versuchsdauer 2 Stunden. Temperatur + 37° C.

Ergebnis: Tabelle XI $\Delta_g = n_D - n_D$ (Lösungsmittel).

Tabelle XI.

Geprüftes Präparat	Δ_a	Δ_b	Δ_c	Δ_d	Δ_e	Δ_f	Δ_g
Plac. I	+0,00002	+0,00000	+0,00004	+0,00003	+0,00004	+0,00002	+0,00002
	+0,00002	+0,00005	+0,00005	+0,00004	+0,00003	+0,00003	+0,00002
Plac. II	+0,00002	+0,00006	+0,00002	+0,00003	+0,00003	+0,00004	+0,00003
	+0,00003	+0,00007	+0,00003	+0,00004	+0,00003	+0,00003	+0,00002
Plac. III	+0,00007	+0,00015	+0,00007	+0,00007	+0,00003	+0,00005	+0,00004
	+0,00012	+0,00013	+0,00007	+0,00006	+0,00005	+0,00005	+0,00005
Pf.-Ser.	+0,00002	+0,00004	+0,00004	+0,00000	+0,00002	+0,00004	+0,00002
	+0,00003	+0,00000	+0,00002	+0,00002	+0,00000	+0,00003	+0,00003
R.-Ser.	+0,00003	+0,00000	+0,00004	+0,00003	+0,00002	+0,00004	+0,00001
	+0,00000	+0,00000	+0,00005	+0,00001	+0,00001	+0,00002	+0,00003

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, ist die Fehlergrenze einer n_D-Bestimmung für Flüssigkeiten der hier untersuchten Art + 0,00002; wir haben also, da jede Zahl der Tabelle aus dem Ergebnis zweier n_D-Bestimmungen gebildet

[1]) Der n_D der Versuchsflüssigkeit ist bei diesem und den folgenden Versuchen einfach mit n_D bezeichnet, der des Lösungsmittels besonders kenntlich gemacht.

[2]) 100 ccm der Lösung enthielten 0,1 ccm einer $^n/_1$-Sodalösung; die Prüfung der Substrate in dieser Lösung wurde deshalb vorgenommen, weil eben diese Lösung bei den Trypsinversuchen als Lösungsmittel für das Ferment diente.

ist, die Fehlergrenze mit $+0{,}00004$ anzusetzen. Man sieht, daß dieser Betrag von einem Teil der Versuchsresultate überschritten oder doch häufiger erreicht wird, als dies der Wahrscheinlichkeit entspricht und sieht ferner, daß alle n_D-Differenzen gleiches Vorzeichen im Sinne einer Konzentrationszunahme haben. Die Substrate erweisen sich also zwar als nicht absolut unlöslich resp. frei von löslichen Stoffen, doch sind, wie die Tabelle zeigt, die durch die Löslichkeit bedingten n_D-Zunahmen im allgemeinen sehr gering; Placenta III stellt schon einen Ausnahmefall dar, der seine Erklärung in der absichtlich abgekürzten Darstellung dieses Präparates findet[1]).

Solche Substrate, die unter den Bedingungen des anzustellenden Fermentversuches geprüft, durch ihre spontane Löslichkeit nie größere n_D-Zunahmen als $+0{,}00005$ bedingten, können als tauglich angesehen werden, da, wie wir später sehen werden, die Fehlergrenze des mit allen Vorsichten angestellten Fermentversuches $+0{,}00005$ beträgt, die zugelassene n_D-Zunahme durch spontane Löslichkeit des Substrates also mit der Fehlergrenze des Versuches zusammenfällt.

Placenta III ausgenommen, erfüllen die obigen und übrigens nach Vorschrift dargestellten Substrate fast ausnahmslos diese hinreichende Bedingung.

Die ausführliche Wiedergabe der Löslichkeitsprüfung unserer Substrate schien mir deswegen nötig, weil es von *P. Hirsch*[2]) bezweifelt wurde, daß die nach den *Pregl*schen Angaben hergestellten Trockenorganproteine den in bezug auf ihre Unlöslichkeit zu stellenden Anforderungen genügen.

4. Quellung der Substrate.

Pregl und *de Crinis*[3]) geben an, daß ihre Trockenorganproteine die Eigenschaft besitzen, in Wasser zu quellen, was sich im folgenden bestätigen wird. Es ist bekannt, daß in Wasser quellbare Körper, wenn man sie in trockenem Zustande in eine wässerige Lösung bringt, zumeist mehr Wasser als Gelöstes aufnehmen und so die Konzentration der Lösung erhöhen. Dies wird unter sonst gleichen Umständen eine um so größere n_D-Zunahme zur Folge haben, je geringer das Brechungsvermögen der vom Körper aufgenommenen Quellungsflüssigkeit im Vergleich zu dem der zurückbleibenden Systemflüssigkeit ist. *Pregl* und *de Crinis* fanden beim Arbeiten mit Serum n_D-Zunahmen bis zu 0,00030[4]), die regelmäßig eintraten, wenn sie die Substrate trocken dem Serum zugesetzt hatten, aber ausblieben, sobald sie schon gequollene Substrate benützten. Um diesen von ihnen aufgezeigten Quellungsfehler zu vermeiden, lassen sie daher die Substrate zunächst in physiologischer Kochsalzlösung quellen, saugen diese dann möglichst vollständig ab und fügen erst solcherart vorbehandelten Substraten das Serum bei.

Ob ein Quellungsfehler auch bei Systemflüssigkeiten von geringerer Konzentration und geringerem Kolloidgehalt, wie ich sie auch benütze, zu berücksichtigen oder zu vernachlässigen ist, ließ sich nicht von vornherein sagen, da viele quellbare Körper bereits Kochsalzlösung durch vorwiegende Wasseraufnahme zu konzentrieren imstande sind und im übrigen die Quellungserscheinungen in hohem Maß von der Gegenwart von Elektrolyten und der Reaktion, wie auch von besonderen Beziehungen zwischen dem quellenden Stoff und dem Quellungsmittel bestimmt werden. Die Frage kann daher in jedem besonderen Fall nur der Versuch entscheiden.

Aus den S. 434 u. 435 beschriebenen Versuchen über die Löslichkeit der Substrate kann man für hier sofort folgendes entnehmen:

---

[1]) Siehe S. 434 Anm. 4.

[2]) *P. Hirsch*, Fermentforschung 2, 251. 1919.

[3]) a. a. O.

[4]) Für die ebendort angegebenen Mengenverhältnisse.

Die Substrate wurden dort in trockenem Zustande der Flüssigkeit zugesetzt und sind daher erst während des Versuches gequollen. Bei den Versuchen mit destilliertem Wasser (*a* bis *c*), bei denen die gefundenen n_D-Zunahmen nur auf der geringen spontanen Löslichkeit der Substrate beruhen konnten, sind sie von gleicher Größenordnung, wie bei den mit neutraler und mit schwach alkalischer 0,86 proz. Kochsalzlösung angestellten Versuchen (*d* bis *g*), wo neben der Auflösung des Substrates Entzug von Quellungswasser ebenfalls im Sinne einer Konzentrationszunahme wirken konnte. Dies zeigt also, daß das Quellen der Substrate in diesen Lösungen keine merkliche n_D-Zunahme zur Folge hat.

Der folgende Versuch betrifft die von mir verwendete Trypsinlösung.

Versuch: 0,1% Trypsinlösung in 0,86 proz. NaCl-Lösung mit einem Sodazusatz zu $^n/_{1000}$; durch Erhitzen inaktiviert. Vor und nach dem Versuch ihr n_D bestimmt.

Versuchsgläschen mit je 0,01 g lufttrockenem Substrat und 0,5 ccm dieser Trypsinlösung beschickt. Nach 24stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur (+18° C) n_D der Trypsinproben, in denen die Substrate gequollen sind, bestimmt.

Ergebnis: Tabelle XII $\Delta = n_D$ (Quellprobe) — n_D (Trypsin 1. Best.).

Tabelle XII.

		n_D	Δ
Trypsinlösung allein vor dem Versuch		1,33526	—
Trypsinlösung + Plac. I	nach 24 Std.	1,33529	+ 0,00003
" + Plac. II		1,33530	+ 0,00004
" + Plac. III		1,33530	+ 0,00004
" + Pl.-Ser.		1,33529	+ 0,00003
" + R.-Ser.		1,33528	+ 0,00002
" allein		1,33527	+ 0,00001

Auch in dieser Lösung bewirkt bei dem im Fermentversuch eingehaltenen Mengenverhältnis das Quellen des Substrates keine n_D-Zunahme, denn die gefundenen kleinen Zunahmen sind durch die Löslichkeit des Substrates erklärt. Demnach wäre es also bei Fermentversuchen in Medien dieser Art nicht nötig, gequollene Substrate zu benützen.

Ich bin aber aus folgenden Gründen dabei geblieben, die Substrate in gequollenem Zustand zu verwenden: Erstens vergeht oft eine beträchtliche Zeit, bis ein trockenes Substratpulver sich benetzt und da das Ferment erst nach erfolgter Benetzung zu wirken beginnen kann, würde also bei Verwendung trockener Substrate das Bestehen der variablen Benetzungszeit es unmöglich machen, den Beginn der Fermentwirkung zeitlich einigermaßen genau festzulegen.

Zweitens ist die Quellung ein Vorgang der im Sinne einer Vergrößerung der freien Oberfläche unter Wasseraufnahme verläuft [1]), weshalb chemische Reaktionen, insbesondere hydrolytische Spaltungen an gequollenen Kolloiden bedeutend rascher vor sich gehen als an geschrumpften; dies gilt auch von Adsorptionsvorgängen und ebenso ist die Diffusion begünstigt: In Einem bieten die Substrate in gequollenem Zustande dem Ferment bessere Angriffsbedingungen dar.

Beim Arbeiten mit Serum ist die Verwendung der gequollenen Substrate nicht nur vorteilhafter, sondern notwendig, da, wie *Pregl* und *de Crinis* gezeigt haben, die Nichtberücksichtigung des Quellungsfehlers zu groben Irrtümern führen müßte. *P. Hirsch* betont dagegen bei der Beschreibung seiner Interferometermethode [2]), daß gerade die vollkommene Trockenheit der Substrate notwendig

[1]) Siehe *H. Bechhold*, Die Kolloide in Biologie und Medizin. III. Aufl., S. 74. Dresden und Leipzig 1920.

[2]) a. a. O.

sei, um fehlerfreie Resultate zu erzielen; an anderer Stelle[1]) stellt er im Gegensatz zu *Pregl* und *de Crinis* in Abrede, daß koagulierte Proteine die Eigenschaft der Quellbarkeit besitzen könnten. Die n_D-Zunahmen, die *Pregl* und *de Crinis* bei Verwendung trockener Substrate beobachtet und auf die Quellung zurückgeführt haben, will *Hirsch* auf zu große Löslichkeit der *Pregl*schen Organproteine bezogen wissen. Nach seinem Hinweis auf die Möglichkeit von Summationsfehlern scheint er das Ausbleiben der n_D-Zunahme bei Verwendung gequollener Substrate damit erklären zu wollen, daß die von der Auflösung der Substrate bedingte Konzentrationszunahme des Serums jetzt gerade dadurch kompensiert würde, daß man mit dem gequollenen und benetzten Substrat etwas Kochsalzlösung hinzufügt.

Die widersprechenden Angaben über die Quellbarkeit scheinen ihre Erklärung darin zu finden, daß sie sich auf *verschiedene Objekte* beziehen, denn die Art der Substratbereitung bei *Hirsch*[2]) ist nicht identisch mit der *Pregl*schen[3]); insbesondere behandelt *Hirsch* seine Substrate zum Schluß mit Aceton, wodurch sie gehärtet und vermutlich hierdurch unquellbar werden, während *Pregl* zum Entwässern nur Alkohol und Äther verwendet. Die Beobachtungen *Hirschs* über die Quellbarkeit *seiner* Präparate sind daher mit den unseren nicht vergleichbar, weshalb sich ein näheres Eingehen auf diesen vielleicht nur scheinbaren Widerspruch erübrigte.

Dagegen ist es notwendig, der Deutung, welche *Hirsch* dem von *Pregl* und *de Crinis* beobachteten Quellungsfehler gibt, folgende Feststellungen entgegenzuhalten:

a) Wenn man die *Pregl*schen Trockenproteine in destilliertes Wasser, Serum oder physiologische Kochsalzlösung einbringt, so tritt nach kurzer Zeit eine deutliche Volumzunahme der Substratteilchen ein, wovon man sich

α) durch den Augenschein leicht überzeugen kann und was

β) die folgenden volumetrischen Versuche eindeutig dartun:

Versuch: Quellung der Substrate in destilliertem Wasser.

Je 0,05 g lufttrockenes und zu einem staubförmigen Pulver zerriebenes Substrat eingewogen in Zentrifugiergläschen mit engem, graduiertem Ansatz, dessen Skala Ablesung der Zehntel und bequemes Schätzen der Hundertel Kubikzentimeter erlaubt. Zunächst zentrifugiert und das Trockenvolumen abgelesen, dann je 0,5 ccm destilliertes Wasser zugesetzt und gut durchgemischt, bis das Substrat ganz benetzt ist. Nun nach bestimmten Zeiten je 5 Minuten zentrifugiert (alle Proben mit der gleichen Tourenzahl) und das Volumen des zu einem kompakten Zylinder zusammengepreßten Substrates bestimmt. Nach jeder Volumbestimmung aufgeschüttelt und die Gläschen bis zur nächsten bei Zimmertemperatur ruhig stehenlassen. Zimmertemperatur +20° C.

Tabelle XIII.

Substrat	Volumen in ccm			
	trocken	Zeit nach dem Wasserzusatz		
		15 Min.	6 Stunden	17 Stunden
Plac. I .	0,10	0,20	0,26	0,27
Pf.-Ser. .	0,08	0,20	0,24	0,25
R.-Ser. .	0,10	0,14	0,19	0,19

[1]) a. a. O.
[2]) Ebendort S. 261 u. 262.
[3]) a. a. O.

Der Versuch ergibt Volumzunahmen bis zum 2- und 3fachen Trockenvolumen, wobei die Substratteilchen ein deutlich glasiges Aussehen bekommen und an Konsistenz verlieren, also eine Veränderung erfahren, die man nicht anders als mit „Quellung" bezeichnen kann. Diese Quellung ist schon nach 15 Minuten sehr deutlich und nimmt dann meist langsamer zu.

Versuch: Quellung der Substrate in Serum.

Statt destillierten Wassers jetzt Serum (Mensch) verwendet; Ausführung genau wie früher. Zimmertemperatur +21° C.

Tabelle XIV.

Substrat	Volumen in ccm			
	trocken	Zeit nach dem Serumzusatz		
		8 Minuten	1 Stunde	14 Stunden
Plac. I .	0,09	0,09	0,27	0,30
Pf.-Ser. .	0,08	0,09	0,22	0,25
R.-Ser. .	0,10	0,10	0,21	0,22

Die Substrate quellen also auch in Serum.

Man hätte beim vorhergehenden Versuch den Einwand machen können, daß die große Differenz zwischen dem trocken und dem in der Flüssigkeit zentrifugierten Substrat durch den Auftrieb, den es im zweiten Falle erfährt, vorgetäuscht sei. Bei dem letzten Versuch nun ist die zweite Ablesung sehr rasch nach dem Flüssigkeitszusatz erfolgt und es haben sich dabei — offenbar weil die Quellung noch nicht merklich eingesetzt hatte — die gleichen Werte ergeben, wie beim Zentrifugieren des trockenen Substrates. Somit ist dieser Einwand hinfällig.

Für die Methodik war es noch von Wichtigkeit, festzustellen, wann bei dem im Fermentversuch eingeschlagenen Verfahren des Quellens jener Quellungsgrad erreicht wird, der innerhalb der üblichen Versuchszeit (24 Stunden) nicht weiter zunimmt. Ferner mußte auch untersucht werden, ob das in physiologischer Kochsalzlösung gequollene Substrat, wenn es nachher in Serum kommt, seinen Quellungszustand nicht merklich ändert.

Versuch: Quellung in physiologischer Kochsalzlösung unter den Bedingungen des Fermentversuches. Gefragt nach der Quellungszeit und nach einer eventuellen Änderung des Quellungszustandes in Serum.

Je 0,05 g Substrat in die grad. Zentrifugiergläschen eingewogen und das Trockenvolumen bestimmt. Dann siedende Kochsalzlösung zugesetzt (Benetzung erfolgt dabei augenblicklich), hierauf 30 Minuten am Wasserbad bei ca. +95° C und weitere 30 Minuten bei Zimmertemperatur gehalten. Dann zentrifugiert und Volumen bestimmt. Hierauf die Kochsalzlösung möglichst vollständig abgegossen und gesaugt, Serum (Mensch) zugesetzt und nach weiteren 8 Stunden neuerlich das Volumen bestimmt. Zimmertemperatur +21° C.

Tabelle XV.

Substrat	Volumen in ccm				
	trocken	Zeit nach dem Zusatz der Kochsalzlösung			Zeit seit dem Zusatz des Serums
		6 Minuten	1 Stunde	24 Stunden	8 Stunden
Plac. I .	0,10	0,26	0,33	0,34	0,34
Pf.-Ser. .	0,08	0,22	0,25	0,25	0,27
R.-Ser. .	0,10	0,19	0,24	0,24	0,24

Man sieht, daß die Substrate auch in Kochsalzlösung quellen, bei dem eingeschlagenen Verfahren 1 Stunde nach dem Zusatz der siedenden Kochsalzlösung das Maximum der Quellung praktisch erreicht ist und sich der Quellungszustand der in Kochsalzlösung gequollenen Substrate beim Einbringen in Serum nicht merklich ändert.

Zusammengefaßt ergeben die Versuche eindeutig, daß die *Pregl*schen Trockenproteine in Wasser und wässerigen Lösungen begrenzt quellbare Körper sind. Soweit die grobe Methodik der volumetrischen Versuche dies zu schätzen gestattet, kann man die im Gleichgewicht aufgenommene Menge des Quellungsmittels mit dem 1—2fachen Trockengewicht der Substrate ansetzen. Unsere Substrate verhalten sich somit wie sog. unelastische Gele.

b) Der Brechungsindex eines Serums, in das man unsere Substrate in ungequollenem Zustande einbringt, nimmt zu. Den von *Pregl* und *de Crinis* mitgeteilten Befunden seien zur Bestätigung dieser Erscheinung eigene *Versuche* hinzugefügt, die wie folgt ausgeführt wurden:

Die Versuchsgläschen mit je 0,01 g lufttrockenem Substrat und je 0,5 ccm Serum (Mensch) beschickt. Nach 24stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur n_D-Bestimmung des „Quellserums" d. h. des Serums, in dem die Substrate gequollen sind. (Zwei Versuche mit jedem Filtrat.) n_D des verwendeten Serums vor und zur Kontrolle auch nach dem Versuch bestimmt. $\Delta = n_D$ (Quellserum) — n_D (Serum 1. Best.).

Tabelle XVI.

Substrat	n_D des Serums vor dem Versuch	n_D des Quellserums	Δ	n_D des Serums nach dem Versuch
Plac. I . .	1,34894	1,34954	+0,00060	1,34898
		1,34949	+0,00055	
„ II . .	1,35015	1,35069	+0,00054	1,35015
		1,35075	+0,00060	
„ III . .	1,35011	1,35085	+0,00074	1,35014
		1,35075	+0,00064	
Pf.-Ser. . .	1,34958	1,34996	+0,00038	1,34957
		1,34999	+0,00041	
R.-Ser. . .	1,34894	1,34937	+0,00043	1,34898
		1,34936	+0,00042	

Das Ergebnis dieser Versuche ist ganz eindeutig: Einbringen der trockenen Substrate in Serum hat eine Konzentrationszunahme des Serums zur Folge. Dazu sei noch bemerkt, daß unter gleichen Bedingungen die n_D-Zunahmen beim gleichen Substrat ziemlich konstante Werte haben, wie sich bei diesen und anderen Versuchen zeigte.

Die festgestellten Konzentrationszunahmen *könnten* dreierlei Ursachen haben:

α) Verdunsten von Flüssigkeit aus dem Versuchsgläschen.

Dies ist mit Sicherheit auszuschließen, da der Verschluß der Gläschen durch die S. 433 beschriebenen Vorsichtsmaßregeln gesichert war und Verdunstungsmarken angebracht waren, die auf das sorgfältigste kontrolliert wurden.

β) Auflösung des Substrates.

Dies ist von vornherein unwahrscheinlich, da sich die gleichen Substrate bei der Prüfung in destilliertem Wasser, neutraler und alkalischer Kochsalzlösung, zum Teil unter viel strengeren Bedingungen, als praktisch unlöslich erwiesen[1]); es wäre also nicht einzusehen, daß die Substrate in *Serum* löslich sein sollten[2])

[1]) Siehe S. 434 u. 435, Versuch *a* bis *g* und Tabelle XI.

[2]) Gegen die Substrate eingestellte Abwehrfermente kamen nicht in Frage.

und dies in so hohem Maße, wie es zur Erklärung der beobachteten n_D-Zunahmen nötig wäre.

γ) Endlich bleibt die von *Pregl* und *de Crinis* gegebene Erklärung der Konzentrationszunahme durch Entzug von Quellflüssigkeit. Für sie spricht die Tatsache, daß die Substrate quellbar sind; ferner ist der Beweis für diese Erklärung dadurch zu erbringen, daß die n_D-Zunahme bei Benützen der Substrate in gequollenem Zustande ausbleiben muß.

Bei den Versuchen von *Pregl* und *de Crinis* trifft das zu, doch erklärt *Hirsch* diese Versuche nicht für beweiskräftig, weil als Quellungsmittel physiologische Kochsalzlösung diente, deren am Substrat und am Versuchsgläschen haftende Reste einen der Konzentrationszunahme gegenläufigen Fehler mit sich bringen. Dieser ist jedoch leicht zu vermeiden, indem man die Substrate nicht in Kochsalzlösung, sondern im gleichen Serum quellen läßt, wie dies in den folgenden Versuchen geschehen ist.

Ausführung der Versuche:

Je 0,01 g Substrat lufttrocken in die Versuchsgläschen eingewogen und je 0,5 ccm Serum zugesetzt. Die so beschickten Gläschen 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen lassen. Hierauf n_D des Quellserums bestimmt. Nun das Quellserum möglichst vollständig abgesaugt und zu dem gequollenen Substrat 0,5 ccm des gleichen Serums zugesetzt. Dann 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen lassen (während dieser Zeit öfters gemischt) und endlich den n_D dieses Serums der zweiten Beschickung bestimmt.

Der n_D des verwendeten Serums zu Beginn und in einer mitgeschickten Kontrollprobe auch am Ende des Versuches bestimmt. (Versuche, bei denen der n_D des Kontrollserums größere Abweichungen gegen den Anfangswert zeigte, verworfen.)

Die folgende Zusammenstellung ist nur ein Auszug aus der ganzen Versuchsreihe; mit jedem Substrat waren mehrere gleichartige Versuche angestellt worden, die ausnahmslos dasselbe Ergebnis lieferten.

In der Tabelle bedeutet

Δ die Differenz : n_D des Quellserums minus n_D des Serums vor dem Versuch.

Δ^* die Differenz : n_D des Serums der 2. Beschickung nach 24 Stunden minus n_D des Serums vor dem Versuch.

Tabelle XVII.

Substrat	n_D des Serums vor dem Versuch	n_D des Quellserums	Δ	n_D des Serums der 2. Beschick. nach 24 Std.	Δ^*	n_D des Serums nach dem Versuch
Plac. I .	1,34965	1,35017	+0,00052	1,34970	+0,00005	1,34966
„ II .	1,34985	1,35038	+0,00053	1,34988	+0,00003	1,34983
„ III .	1,35017	1,35082	+0,00065	1,35020	+0,00003	1,35013
Pf.-Ser. .	1,35016	1,35065	+0,00049	1,35017	+0,00001	1,35017
R.-Ser. .	1,34946	1,34982	+0,00036	1,34951	+0,00005	1,34947

Die Versuche zeigen, daß n_D-Zunahmen von etwa 0,00030 bis über 0,00060 eintreten, wenn man die Substrate ungequollen und ausbleiben, wenn man sie gequollen in das Serum einbringt. Da ich die Substrate in Serum selbst quellen ließ, konnte das Serum der zweiten Beschickung durch das an den Substraten und Gläschen haftende Quellungsmittel nicht *verdünnt* sein, denn das Quellserum war ja konzentrierter als das zweite Serum; um so beweisender ist es, daß die im Serum der zweiten Beschickung auftretenden n_D-Zunahmen nicht größer sind als es der spurenweisen Löslichkeit der Substrate in Wasser und physiologischer Kochsalzlösung entspricht. Die Versuche zeigen also überdies, daß die Substrate in Serum eher noch weniger löslich sind als in den früher genannten Lösungsmitteln.

Der Einwand Hirschs entfällt also bei diesen Versuchen und der Zusammenhang der n_D-Zunahmen, die man bei Verwendung der Preglschen Präparate in ungequollenem Zustande beobachtet, mit der Quellung ist zur Evidenz erhoben.

Für die Methodik ergibt sich also in Übereinstimmung mit *Pregl* und *de Crinis* folgendes: Der „Quellungsfehler" ist beim Quellen der Substrate in Serum und bei den in meinen Versuchen eingehaltenen Mengen (0,01 g Substrat in 0,5 ccm Serum) von solcher Größenordnung, daß seine Vernachlässigung einen groben Fehler bedeutete. Es muß also beim Arbeiten mit Serum unter unseren Versuchsbedingungen gefordert werden, ihn in der von den genannten Autoren angegebenen Weise dadurch zu vermeiden, daß man die Substrate vor dem Zusammenbringen mit dem zu untersuchenden Serum quellen läßt. Als Quellungsmittel benütze ich wie *Pregl* und *de Crinis* physiologische Kochsalzlösung, die dem in die Versuchsgläschen eingewogenen Substrat siedend zugesetzt wird. Ich bringe die Gläschen dann für eine halbe Stunde auf das Wasserbad (ca. +95° C) und lasse sie dann noch mindestens ebensolange bei Zimmertemperatur stehen: Das Maximum der Quellung ist dann sicher praktisch erreicht[1]). Hierauf wird die Kochsalzlösung mit einer Capillare möglichst vollständig abgesaugt und nun kann zu dem gequollenen Substrat das Serum zugesetzt werden. Eine Änderung des Quellungszustandes im Serum ist nicht zu befürchten[1]).

5. *Die Verwendung gequollener Substrate* hat sich also beim Arbeiten mit Serum wegen des Quellungsfehlers als notwendig erwiesen und ich hielt daran aus den S. 437 angeführten Gründen auch dort fest, wo dieser Fehler nicht in Betracht kam; andererseits bringen aber die gequollenen Substrate eine neue Fehlerquelle mit sich. Diese ist dadurch gegeben, daß mit dem gequollenen und benetzten Substrat eine unbekannte Menge von der Kochsalzlösung, die man als Quellungsmittel benutzt hat, zur Fermentlösung bzw. zum Serum hinzukommt, womit sich die Konzentration und das Volumen des flüssigen Systemanteiles ändert. Dies kann in verschiedener Weise zur Fehlerquelle werden, weil sich erstens mit der Konzentration der Brechungsindex ändert und weil zweitens die Abbaugröße von der Fermentkonzentration abhängt; drittens sind die zur Beobachtung kommenden n_D-Zunahmen bei gegebener Abbaugröße abhängig von dem Volumen, über das sich die gelöste Substratmenge verteilt. Die beiden letztgenannten Einflüsse gehören in die zweite Gruppe der Fehler und werden dort besprochen. Hier handelt es sich nur darum, ob und in welchem Maße die mit den gequollenen Substraten in das Reaktionssystem eingeführte Kochsalzlösung den Brechungsindex zu beeinflussen und dadurch eventuell das Resultat zu verfälschen imstande ist. Das wird natürlich um so mehr der Fall sein können, je mehr von dem hinzukommenden Quellungsmittel sich mit der Systemflüssigkeit mischt und ein je größerer Unterschied zwischen den Brechungsindices beider besteht.

Die gesamte Flüssigkeitsmenge, die zurückbleibt, nachdem man dem Substrat Kochsalzlösung zum Quellen zugesetzt und diese dann wieder abgesaugt hat, will ich die *Restflüssigkeit* nennen; sie ist zum Teil als *Quellflüssigkeit* im Substrat enthalten, zum anderen Teil haftet sie diesem und den Wänden des Versuchsgläschens als *Benetzungsflüssigkeit* an.

Die *Quellflüssigkeit* kommt als Fehlerquelle kaum in Betracht, da beschränkt quellbare Körper bis zum Eintritt eines Gleichgewichtszustandes quellen und die ihnen im Gleichgewicht zukommende Flüssigkeitsmenge festhalten. Allerdings wäre daran zu denken, daß das Gleichgewicht, welches in der als Quellungsmittel verwendeten physiologischen Kochsalzlösung sich eingestellt hat, nicht auch für die Systemflüssigkeit zu Recht bestehen muß; es könnte daher, wenn die in der Kochsalzlösung maximal gequollenen Substrate dann in die Fermentlösung oder

[1]) Siehe Versuch S. 439, Tabelle XV.

in Serum kommen, eine teilweise Entquellung eintreten und etwas von der Quellflüssigkeit abgegeben werden. Bei Systemflüssigkeiten, wie bei meiner Trypsinlösung, deren n_D nur um etwa 30 Einheiten der 5. Dezimale von dem der Quellflüssigkeit abweicht, kommt dies als Fehlerquelle von vornherein nicht in Frage, weil selbst die Beimischung der ganzen Quellflüssigkeit noch keine störende n_D-Änderung bewirken könnte. (Ich führe den rechnerischen Beweis hierfür nicht aus, da er sich aus dem folgenden a fortiori ergibt.) Für den Fall des Serums zeigt der volumetrische Versuch S. 439, Tabelle XV, daß die in physiologischer Kochsalzlösung maximal gequollenen Substrate ihren Quellungszustand in Serum nicht merklich ändern; also ist auch hier keine Abgabe von Quellflüssigkeit zu befürchten. Ebensowenig kommen jene geringen Mengen an Quellflüssigkeit in Betracht, die bei der fermentativen Auflösung des Substrates frei werden, da, wie man sich leicht durch eine Überschlagsrechnung überzeugen kann, ihr Einfluß auf den n_D der Systemflüssigkeit außerhalb des Beobachtungsbereiches fällt.

Da also die Quellflüssigkeit als Fehlerquelle ausscheidet, haben wir unser Augenmerk nur auf die *Benetzungsflüssigkeit* zu richten, die so gut wie allein den schädlichen Teil der Restflüssigkeit ausmacht: Während die Menge der Quellflüssigkeit unter gleichen Versuchsbedingungen für ein bestimmtes Substrat als angenähert konstant anzusehen ist, wird die Menge der Benetzungsflüssigkeit in hohem Maße davon abhängig sein, wie man im einzelnen Falle beim Absaugen der Kochsalzlösung vom gequollenen Substrat verfährt. Man wird natürlich bestrebt sein, sie möglichst vollständig zu entfernen, wobei man andererseits merkliche Substratverluste vermeiden muß. Ich zentrifugiere nach dem Quellen kurz und bediene mich beim Absaugen eines Glasröhrchens, das eine Erweiterung besitzt und an einem Ende zu einer Capillare ausgezogen ist; 4—5 mm vor ihrer Mündung ist sie um etwa 45° umgebogen und diese Biegung ermöglicht es, sich während des Absaugens an der Innenwand des Versuchsgläschens bis an dessen Grund hinabzutasten, wobei das Anliegen der Capillarmündung an der Gefäßwand das Mitreißen von Substratpartikeln möglichst verhindert. Besonders ist darauf zu achten, daß an der Stelle, wo sich das Versuchsgläschen zum Stoppelhals verjüngt, keine Flüssigkeitsreste zurückbleiben.

Daß bei diesem recht primitiven Verfahren, das aber unter den gegebenen Umständen sich nicht umgehen läßt, erhebliche Mengen der Kochsalzlösung zurückbleiben, ist vorauszusehen; inwieweit dies zu berücksichtigen ist oder vernachlässigt werden kann, läßt sich wie folgt ermitteln: Die *Restflüssigkeit* (das ist die gesamte nach dem Absaugen zurückgebliebene Flüssigkeitsmenge) findet man unmittelbar durch Wägung.

Ausführung der Wägeversuche:

Ein exakt getrocknetes und mit 0,01 g lufttrockenem Substrat beschicktes Versuchsgläschen auf der analytischen Wage gewogen (1. Wägung). Hierauf siedende physiologische Kochsalzlösung zum Quellen zugesetzt. Nach einer Stunde die Kochsalzlösung in gewöhnlicher Weise abgesaugt und dann das Gläschen samt Inhalt wieder gewogen (2. Wägung).

2. Wägung — 1. Wägung = Restflüssigkeit.

In der Tabelle XVIII sind die Ergebnisse einiger solcher Versuche zusammengestellt.

Wieviel von der durch Wägung bestimmten Restflüssigkeit vom Substrat als Quellflüssigkeit gebunden bzw. als Benetzungsflüssigkeit frei ist, läßt sich durch folgende Überlegung erschließen:

Auf Grund eines Vergleiches der S. 439 in Tabelle XIV und XV zusammengestellten volumetrischen Versuche, darf man annehmen, daß die Substrate in physiologischer Kochsalzlösung und in Serum gleich stark quellen, d. h. das gleiche

Tabelle XVIII.

Substrat	1. Wägung g	2. Wägung g	Restflüssigkeit g
Plac. I	1,406	1,443	0,037
	1,790	1,830	0,040
Pf.-Ser.	1,816	1,861	0,045
	1,607	1,646	0,039
R.-Ser.	1,407	1,451	0,044
	1,730	1,841	0,051

Flüssigkeitsvolumen aufnehmen. Ferner wollen wir annehmen, daß die Substrate beim Quellen in Serum diesem eine Salzlösung entziehen, welche ungefähr den n_D einer physiologischen Kochsalzlösung hat. (Diese Annahme stützt sich darauf, daß die Konzentration einer Salzlösung vom Verdünnungsgrad der physiologischen Kochsalzlösung durch ein in ihr quellendes Substrat nicht erhöht wird, übrigens auch dann nicht, wenn man relativ viel größere Substratmengen anwendet als dies z. B. bei den Versuchen S. 435 Tabelle XI *d—g* geschehen ist. Nun kann man die Größenordnung der vom Substrat aufgenommenen Quellflüssigkeit aus der n_D-Zunahme berechnen, die eintritt, wenn in einem bekannten Serumvolumen eine bekannte Substratmenge quillt.

In dem kleinen Bereich, über das sich unsere Rechnung erstrecken wird, gilt für den n_D eines Kochsalzlösung-Serumgemisches die Mischregel [1]):

$$n = \frac{V_1 n_1 + V_2 n_2}{V_1 + V_2}, \tag{1}$$

[1]) Die *Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der Mischregel* (1) ergeben sich aus der folgenden Betrachtung:

Man bezeichnet mit v das wahre und mit V das scheinbare Volumen einer Substanz und versteht unter dem Ausdruck:

$$\frac{v}{V} = U \tag{2}$$

die Raumerfüllung.

Nach der Theorie von *Clausius-Mosotti* ist

$$\frac{U}{d} = R, \tag{3}$$

wobei R die spezifische Refraktion und d die Dichte der Substanz bedeutet. Einsetzen von (2) in (3) ergibt

$$\frac{v}{V} = R \cdot d$$

und daher

$$v = R \cdot d \cdot V. \tag{4}$$

Die Additivität der wahren Volumina drückt sich aus durch:

$$v = v_1 + v_2, \tag{5}$$

wobei v, v_1 und v_2 das wahre Volumen des Gemisches bzw. seiner Bestandteile bedeutet. Führen wir nun in (5) für die wahren Volumina den Ausdruck (4) ein, so bekommen wir:

$$R \cdot d \cdot V = R_1 \cdot d_1 \cdot V_1 + R_2 \cdot d_2 \cdot V_2. \tag{6}$$

Mit R, d und V sind spezifische Refraktion, Dichte und scheinbares Volum des Gemisches und mit den mit Indices versehenen Symbolen die entsprechenden Größen der Bestandteile des Gemisches bezeichnet.

Unter der *Bedingung* nun, daß für die spezifische Refraktion mit genügender

wobei n den Brechungsindex des Gemisches, n_1 und n_2 die Brechungsindices V_1 und V_2 die Volumina der Komponenten bedeuten.

Wir wenden nun die Mischregel (1) so an, daß wir das unveränderte Serum als ein Gemisch des Quellserums[1]) und der Quellflüssigkeit ansehen und identifizieren also:

n_1 und V_1 mit dem Brechungsindex bzw. dem Volumen des Quellserums,
n_2 „ V_2 „ „ „ „ „ „ der Quellflüssigkeit u.
n „ V „ „ „ „ „ „ des benützten, noch unveränderten Serums.

Unter Berücksichtigung der Beziehung

$$V = V_1 + V_2 \tag{2}$$

lösen wir (1) nach V_2 auf und bekommen für das Volumen der Quellflüssigkeit den Ausdruck:

$$V_2 = \frac{n_1 - n}{n_1 - n_2} V \tag{3}$$

der in der Form

$$V_Q = \frac{\Delta_1}{\Delta_2} V_S \tag{4}$$

geschrieben sei.

Dabei ist V_S das Volumen des zum ungequollenen Substrat zugesetzten Serums

$\Delta_1 = n_D$ (Quellserum) — n_D (unverändertes Serum),
$\Delta_2 = n_D$ (Quellserum) — n_D (Quellflüssigkeit),

und V_Q das gesuchte Volumen der Quellflüssigkeit.

Wenn wir nun gemäß unserer zweiten eingangs gemachten Annahmen den n_D der Quellflüssigkeit gleich dem einer physiologischen Kochsalzlösung (1,33485) setzten und für die anderen Größen die spez. Werte aus den Versuchen S. 440 Tabelle XVI und S. 441 Tabelle XVII einsetzen, ergibt die Ausrechnung folgendes für Δ_1, Δ_2 und V_Q:

Annäherung der einfachste Ausdruck (als *Arago-Biot-Gladstone-Brühl*sche Konstante bekannt)

$$R = \frac{n-1}{d} \tag{I}$$

gilt, geht (6) über in

$$(n - 1)\, V = (n_1 - 1)\, V_1 + (n_2 - 1)\, V_2\,, \tag{7}$$

wobei n, n_1 und n_2 die Brechungsindices, V, V_1 und V_2 die scheinbaren Volumina bedeuten.

Daraus folgt für den Brechungsindex des Gemisches:

$$n = \frac{V_1 n_1 + V_2 n_2}{V} + \frac{V - (V_1 + V_2)}{V}\,. \tag{8}$$

Unter der *weiteren Bedingung* nun, daß beim Mischen keine Volumkontraktion eintritt, also

$$V = V_1 + V_2 \tag{II}$$

ist, verschwindet das zweite Glied des Ausdruckes (8) und er geht über in unsere Form:

$$n = \frac{V_1 n_1 + V_2 n_2}{V_1 + V_2}\,. \tag{1}$$

[1]) Das gleiche Serum, dem aber von einem in ihm gequollenen Substrat Quellflüssigkeit entzogen wurde und dessen Konzentration daher zugenommen hat.

Tabelle XIX.

Substrat	I_1	I_2	$V_Q = \frac{I_1}{I_2} V_S$	Quellflüssigkeit (Mittelwerte) ccm
Plac. I . .	+0,00060	+0,01469	0,020	
	+0,00055	+0,01464	0,019	**0,019**
	+0,00052	+0,01532	0,017	
Pf.-Ser. .	+0,00038	+0,01511	0,013	
	+0,00041	+0,01514	0,013	**0,014**
	+0,00049	+0,01580	0,015	
R.-Ser.. .	+0,00043	+0,01452	0,015	
	+0,00042	+0,01451	0,014	**0,014**
	+0,00036	+0,01497	0,012	

Die so berechneten Werte der *Quellflüssigkeiten* schwanken für ein bestimmtes Trockenprotein nur innerhalb enger Grenzen, sind aber für verschiedene Präparate oft deutlich verschieden.

Es sei bemerkt, daß die hier aus nur 3 Versuchen gebildeten Mittelwerte übereinstimmen mit den Mittelwerten einer ganzen Versuchsreihe, die für jedes Präparat 10 Versuche umfaßt.

Nun benützen wir unsere erste Annahme, nämlich daß die Substrate in physiologischer Kochsalzlösung gleichstark quellen wie in Serum und finden durch Subtraktion der mittleren Quellflüssigkeit des betreffenden Substrates von der durch Wägung ermittelten Restflüssigkeit die *Benetzungsflüssigkeit.* In der folgenden Tabelle ist dies für die S. 444 Tabelle XVIII zusammengestellten Versuche durchgeführt:

Tabelle XX.

Substrat	Restflüssigkeit	Quellflüssigkeit	Benetzungsflüssigkeit
Plac. I .	0,037	0,019	0,018
	0,040		0,021
Pf.-Ser. .	0,045	0,014	0,031
	0,039		0,025
R.-Ser. .	0,044	0,014	0,030
	0,051		0,037

Wir konnten die Werte der Tabellen XVIII und XIX unmittelbar benützen, obwohl die Quellflüssigkeit in Kubikzentimetern und die Restflüssigkeit in Gramm angegeben ist; denn das spezifische Gewicht einer physiologischen Kochsalzlösung weicht erst in der 3. Dezimale von dem des Wassers ab, so daß man 1 g = 1 ccm setzen darf. Ebenso konnte die bei der Quellung bekanntlich eintretende Volumkontraktion vernachlässigt werden.

Um nun die Größenordnung des Fehlers kennenzulernen, den die Benetzungsflüssigkeit *schlimmsten* Falles verursachen kann, sei die folgende Berechnung unter den ungünstigsten Anfangsbedingungen angesetzt:

Wir entnehmen also aus der Tabelle XVIII den *größten* Wert für die Restflüssigkeit . . . . $V_R = 0{,}051$
aus der Tabelle XIX den *kleinsten* für die Quellflüssigkeit . . . . $V_Q = 0{,}012$
und erhalten so eine *möglichst große Benetzungsflüssigkeit* . . . . $V_B = 0{,}039$

Diesen Wert runden wir nach oben auf 0,04 ab.

Welchen Einfluß auf den n_D der Systemflüssigkeit es hat, wenn diese 0,04 ccm physiologischer Kochsalzlösung zu den in meinen Versuchen angewendeten 0,5 ccm Fermentlösung oder Serum hinzukommen, ergibt sich aus der Mischregel (1). Für den Fall einer 0,1 proz. Trypsinlösung vom $n_D = 1{,}33522$ haben wir also in (1) einzusetzen für n_1 1,33522
„ V_1 0,5
„ n_2 1,33485 (n_D der physiologischen Kochsalzlösung)
„ V_2 0,04 und erhalten für den Brechungsindex des Gemisches n_D 1,33519, also für $n - n_1 = -0{,}00003$; für den Fall des Serums setzen wir für
n_1 1,34965 ein, was einem menschlichen Serum von mittlerem Brechungsvermögen entspricht; die übrigen Größen bleiben dieselben. Jetzt ergibt die Rechnung für

$$n = 1{,}34855 \text{ und für } n - n_1 = -0\,00110.$$

Es zeigt sich also, daß bei Versuchen mit einer Fermentlösung, deren n_D von dem des Quellungsmittels (physiologische Kochsalzlösung) nicht sehr erheblich abweicht, der Einfluß der Benetzungsflüssigkeit selbst unter den ungünstigsten Annahmen zu vernachlässigen ist.

Anders beim Arbeiten mit Serum: Wenn auch kaum solche n_D-Abnahmen zu erwarten sein werden, wie wir sie hier als Maximalwert fanden, so wird man doch mit einem Einfluß der Benetzungsflüssigkeit zu rechnen haben, der Berücksichtigung verlangt. Man kann sich hiervon leicht überzeugen, indem man den n_D des unverdünnten Serums vergleicht mit dem n_D des gleichen Serums, das man zu dem in der Kochsalzlösung gequollenen Substrat hinzugefügt hat; regelmäßig beobachtet man n_D-Abnahmen, die bei Einhalten des Verhältnisses: 0,5 ccm Serum zu 0,01 g Substrat im Mittel von der Größenordnung der unten wiedergegebenen sind:

Tabelle XXI.

		n_D	n_D verdünnt $- n_D$ unverd.
Serum unverdünnt . .		1,34873	—
Serum + Plac. I	gequoll.	1,34844	−0,00029
„ + Pf.-Ser.	gequoll.	1,34840	−0,00033
„ + R.-Ser.	gequoll.	1,34843	−0,00030

Die größten derartigen n_D-Abnahmen, die ich beobachtet habe, betrugen etwas mehr als 0,00060.

Um zu verhindern, daß diese von der Beimischung der Benetzungsflüssigkeit zum Serum bedingten n_D-Abnahmen im Fermentversuch zur Fehlerquelle werden, kann man in verschiedener Weise vorgehen:

Kommt es nicht darauf an, mit unverdünntem resp. mit Serum bestimmter Konzentration zu arbeiten, so genügt es, wenn man Vorsorge trifft, daß die erste n_D-Bestimmung nicht früher erfolgte, als bis sich die Benetzungsflüssigkeit praktisch vollständig mit dem Serum gemischt hat. *Pregl* und *de Crinis* geben daher die Vorschrift, daß man nach dem Serumzusatz gut umzuschütteln und bis zur ersten n_D-Bestimmung 5—10 Minuten zu warten habe. Um ganz sicher zu sein, daß nicht etwa durch einen vor der ersten Bestimmung noch nicht vollendeten Konzentrationsausgleich ein Abbau ganz oder teilweise verdeckt werden könne, verwende ich zur Unterstützung des Ausgleiches einen einfachen Mischapparat. Er besteht aus einer 2fach gelagerten Achse, die außer der Antriebsrolle einen Korkstoppel von

ca. 60 mm Durchmesser trägt; der Kork ist an seiner Peripherie mit radiär angeordneten Löchern versehen, in welche der Stiel *F* des S. 433 abgebildeten Gefäßhalters paßt. Den Antrieb besorgt ein kleiner Elektromotor mittels Schnurübertragung. Ich bringe die beschickten Versuchsgläschen in ihren Haltern auf den Mischer und lasse sie bei etwa 17 Umdrehungen des Mischers per Minute 15 Minuten lang rotieren, bevor ich die Probe zur ersten n_D-Bestimmung entnehme. Daß damit eine praktisch vollkommene Mischung erreicht ist, erkennt man in der folgenden Zusammenstellung daran, daß der unmittelbar nach dem Mischen bestimmte n_D der Systemflüssigkeit in den folgenden 24 Stunden nicht weiter abnimmt. (Beachte die kleine n_D-Abnahme des Serums in der Kontrollprobe, die in Abzug zu bringen ist.)

Tabelle XXII.

	n_{D_1} gleich nach dem Mischen	n_{D_2} nach 24 Std.	$n_{D_2} - n_{D_1}$
Je 0,5 ccm Serum + 0,01 g gequollenes Substrat, 5 Minuten am Mischer gemischt	1,35082	1,35086	+0,00004
	1,35080	1,35077	−0,00003
	1,35077	1,35079	+0,00002
	1,35086	1,35089	+0,00003
	1,35084	1,35080	−0,00004
	1,35075	1,35077	+0,00002
Kontrolle: Serum allein	1,35107	1,35103	−0,00004

Eine andere, etwas umständlichere Methode ist die, das dem Substrat nach dem Absaugen der Kochsalzlösung zugesetzte Serum nach gründlichem Mischen abermals abzusaugen und als „Waschserum" zu verwerfen; dann erst wird der Versuch mit neuem Serum endgültig angesetzt. *H. Meyer*[1]) bedient sich dieser Methode des Waschens, die den Vorteil hat, daß man den Versuch mit praktisch unverdünntem Serum macht. Ich verfahre dabei wie folgt: Nach dem Absaugen der Kochsalzlösung werden 0,5 bis 1 ccm [2]) des Serums zum gequollenen Substrat zugesetzt; hierauf kommen die Versuchsgläschen für 5 Minuten auf den Mischer. Nach kurzem Zentrifugieren wird das Waschserum abgesaugt und die endgültige Beschickung vorgenommen, worauf ich gut umschüttle, abermals zentrifugiere und dann die Probe zur ersten n_D-Bestimmung entnehme.

Eine unter den ungünstigsten Bedingungen angesetzte Rechnung ergibt, daß nach einmaligem Waschen mit 0,5 bzw. 1 ccm Serum das Serum der endgültigen Beschickung eine n_D-Abnahme von höchstens 0,00008 bzw. 0,00004 erfahren kann[3]). Wie früher zeigen die Versuche, daß die berechneten Maximalwerte nicht erreicht werden und diese Methode des einmaligen Waschens genügt, wenn man mit unverdünntem Serum arbeiten will. Als experimenteller Beleg mögen die Versuche der Tabelle XXIVa und b dienen, denen man entnehmen kann, daß der n_D des Serums der zweiten Beschickung, das man zu dem mit 0,5 ccm desselben Serums gewaschenen Substrat zugesetzt hat, in den folgenden 24 Stunden (bei öfter wiederholtem Mischen) nicht mehr abnimmt.

---

[1]) *H. Meyer*, diese Zeitschr. **114**, 194. 1921.

[2]) Je nachdem, wieviel zur Verfügung steht.

[3]) Der Ansatz ist so gemacht, daß angenommen ist, es bleiben von der Kochsalzlösung 0,04 ccm als Benetzungsflüssigkeit zurück; diese mischt sich mit dem Waschserum, von dem wieder 0,04 ccm zurückbleiben mögen. Als n_D des verwendeten Serums ist 1,34965 angenommen.

Tabelle XXIII
(aus den Werten der Tabelle XXIV a und b zusammengestellt).

		$n_D - n_{D(S_2)}$
I	Serum + Plac. I	+0,00006
II		+0,00004
Kontrolle:	Serum allein	+0,00003
III	Serum + Pf.-Ser.	+0,00002
IV		+0,00010 *)
V	Serum + R.-Ser.	−0,00003
VI		−0,00001
Kontrolle:	Serum allein	−0,00002

*) Zunahme infolge Verdunstens.

Bei der rechnerischen Untersuchung der Fehlermöglichkeiten, die mit der Verwendung gequollener Substrate zusammenhängen, bin ich von Annahmen ausgegangen, die sich aus bestimmten Vorstellungen über die Quellung der *Pregl*schen Trockenproteine ergaben. Es soll nun an einem Versuch, bei dem ich alle der Messung zugängliche Größen bestimmt habe, gezeigt werden, daß die Ergebnisse einer unter diesen Annahmen angesetzten Rechnung in guter Übereinstimmung mit der Erfahrung stehen, womit ich sowohl die mittels dieser Annahmen durchgeführte Fehlerdiskussion stützen als auch dartun will, daß die zugrunde liegenden Vorstellungen über die Vorgänge bei der Quellung der Substrate berechtigte sind.

Versuch: Je 0,01 g Substrat in exakt getrocknete Versuchsgläschen eingewogen; Versuchsgläschen + Substrat gewogen (1. Wägung). Dann physiologische Kochsalzlösung siedend zugesetzt und 30 Minuten am Wasserbad, hierauf 30 Minuten bei Zimmertemperatur quellen lassen. n_D der Kochsalzlösung bestimmt ($n_{D(K)}$), diese dann abgesaugt und nun Versuchsgläschen samt Inhalt neuerdings gewogen (2. Wägung). Je 0,5 ccm Serum (Mensch normal) zugesetzt, 5 Minuten am Mischer gemischt und dann nach kurzem Zentrifugieren den n_D dieses Waschserums bestimmt ($n_{D(W)}$). Waschserum abgesaugt und neuerdings 0,5 ccm Serum zugesetzt. Gläschen wohlverschlossen (Verdunstungsmarke) in ihren Haltern bei Zimmertemperatur liegenlassen; gleich nach der endgültigen Beschickung und dann alle 8 Stunden für je 30 Minuten auf den Mischer gebracht. 24 Stunden nach der endgültigen Beschickung n_D-Bestimmung (n_D). Der n_D des verwendeten Serums wurde vor Versuchsbeginn ($n_{D(S_1)}$), zur Zeit der endgültigen Beschickung ($n_{D(S_2)}$) und nach dem Versuchsende ($n_{D(S_3)}$) bestimmt.

Tabelle XXIV a.

	Substrat	1. Wägung g	2. Wägung g	$n_{D(K)}$ der Kochsalzlösung nach dem Absaugen	$n_{D(W)}$ des Waschraums	n_D des Serums der zweiten Beschickung nach 24 Std.	Verdunstungsmarke
I*)	Plac. I	1,806	1,830	1,33498	1,34972	1,35001	gut
II		1,537	1,570	1,33498	1,34958	1,34999	„
III	Pf.-Ser.	1,825	1,848	1,33497	1,34962	1,34988	„
IV		1,791	1,814	1,33498	1,34963	1,34996	schlecht
V	R.-Ser.	1,806	1,823	1,33498	1,34964	1,34983	gut
VI		1,536	1,556	1,33497**)	1,34962	1,34985	„

*) Versuch I und II ist mit einem, III bis VI mit einem anderen Serum gemacht.
**) Der Rechnung zugrunde gelegt: $n_{D(K)} = 1,33498$.

Tabelle XXIV b.

Serum-kontrollen zu Versuch	$n_{D\,(S_1)}$ des Serums vor dem Versuch	$n_{D\,(S_2)}$ des Serums zur Zeit der endgültigen Beschickung	$n_{D\,(S_3)}$ des Serums nach dem Versuch
I und II	1,34996	1,34995	1,34998
III bis VI	1,34985	1,34986	1,34984

a) Indirekte Berechnung der Benetzungsflüssigkeit aus den Wägungen und der n_D-Zunahme von Serum, in dem man Substrate hat quellen lassen unter folgenden Voraussetzungen:

1. Die Substrate sind beschränkt quellbare Körper.
2. Sie nehmen beim Quellen in physiologischer Kochsalzlösung und in Serum das gleiche Flüssigkeitsvolumen auf.
3. Der Quellungszustand der in physiologischer Kochsalzlösung gequollenen Substrate ändert sich in Serum nicht.
4. Die Substrate entziehen beim Quellen in Serum diesem eine Lösung vom ungefähren Brechungsvermögen einer physiologischen Kochsalzlösung ($n_D = 1{,}33485$), wodurch die n_D-Zunahmen des Quellserums zu erklären sind, weil
5. die Substrate in physiologischer Kochsalzlösung und Serum praktisch unlöslich sind.

Unter der Voraussetzung 1., 4. und 5. konnten wir aus den n_D-Zunahmen von Quellsera die Quellflüssigkeit berechnen und haben für die im vorliegenden Versuch verwendeten Präparate folgende Mittelwerte gefunden (siehe S. 446 Tabelle XX)

für Plac. I. . . . . 0,019 ccm
„ Pf.-Ser. . . . . 0,014 „
„ R.Ser. . . . . 0,014 „

Nun übertragen wir die so ermittelten Werte unter der Voraussetzung 2. auf das Quellen in physiologischer Kochsalzlösung beim jetzt behandelten Versuch. Die Restflüssigkeiten sind uns aus den Wägungen gegeben und so binden wir die Benetzungsflüssigkeit unter der Voraussetzung 3. in jedem einzelnen Fall aus der Beziehung:

$$V_R = V_Q + V_B \text{ als } V_B = V_R - V_Q \text{ [1]} \qquad (5)$$

b) Direkte Berechnung der Benetzungsflüssigkeit aus der n_D-Abnahme des Waschserums gegen den n_D des unverdünnten Serums: Da uns diese Differenz $\Delta_1 = n_{D\,(S_1)} - n_{D(W)}$ für jeden einzelnen Fall bekannt ist, können wir die jedesmal vorhandene Benetzungsflüssigkeit auch unmittelbar finden, wobei nichts vorausgesetzt wird als die Gültigkeit der Mischregel (1) für Serum-Kochsalzlösunggemische.

Die Anwendung der Formel (1) ist hier schon deshalb ohne weiteres erlaubt, weil die allenfalls möglichen Abweichungen vom additiven Verhalten in der folgenden Rechnung vernachlässigt werden könnten; überdies ist es experimentell belegt, daß bei solchen Gemischen Proportionalität zwischen n_D und Konzentration besteht[2]).

Für die Benetzungsflüssigkeit bekommen wir aus der Mischregel

$$V_B = \frac{\Delta_1}{\Delta_2} V_W \text{ [3]}, \qquad (4\,a)$$

[1]) Es bedeutet V_R . . . die Restflüssigkeit, V_Q . . . die Quellflüssigkeit und V_B . . . die Benetzungsflüssigkeit.

[2]) Sieh *Robertson*, Die physikalische Chemie der Proteine (deutsch), S. 317 u. f. Dresden 1911.

[3]) Vgl. S. 444 Formel (4).

wobei V_W das zum Waschen zugesetzte Serumvolumen (0,5 ccm) bedeutet und

$$\Delta_1 = n_D\,(\text{unverd. Serum}) - n_D\,(\text{Waschserum}),$$
$$\Delta_2 = n_D\,(\text{Waschserum}) - n_D\,(\text{Benetzungsflüssigkeit}) \text{ ist.}$$

Die folgende Tabelle gibt nun die Gegenüberstellung einerseits der *indirekten Berechnung* der Benetzungsflüssigkeiten unseres Versuches, die auf den Voraussetzungen 1. bis 5. beruht und andererseits der *direkten*, bei der sich die Benetzungsflüssigkeiten unmittelbar aus den n_D-Abnahmen der Waschsera ergeben:

Tabelle XXV.

	V_K	V_B	V_B	Δ_1	Δ_2	V_B'	Differenz $V_B - V_B'$ (ccm oder g)
I	0,024	0,019	0,005	0,00024	0,01474	0,008	−0,003
II	0,033		0,014	0,00038	0,01460	0,013	+0,001
III	0,023	0,014	0,009	0,00023	0,01464	0,008	+0,001
IV	0,023		0,009	0,00022	0,01465	0,007	+0,001
V	0,017	0,014	0,003	0,00021	0,01466	0,007	−0,004
VI	0,020		0,006	0,00023	0,01464	0,008	−0,002

Die Übereinstimmung der auf diesen verschiedenen Wegen gewonnenen Ergebnisse ist um so bemerkenswerter, als der durch Wägung ermittelte Wert der Restflüssigkeit sehr leicht mit einem Fehler behaftet sein kann, der entstehen muß, wenn beim Absaugen der Kochsalzlösung etwas Substrat verloren geht und die beiden größeren Abweichungen von 3 und 4 mg das diesem Fehler entsprechende Vorzeichen haben.

Aus dem vorhergehenden hat sich also ergeben, daß die Verwendung der Preglschen Trockenproteine in gequollenem Zustande nicht nur angezeigt (bei verdünnten Fermentlösungen) bzw. **notwendig** *(beim Serum), sondern auch* **zulässig** *ist, da man den Fehlermöglichkeiten, die das Hinzukommen von Quellungsmittel zur Systemflüssigkeit mit sich bringt, durch einfache Maßnahmen begegnen kann.*

Als Nebenergebnis zeigt die gute Übereinstimmung der Versuchsresultate mit denen der Rechnung, daß die ihr zugrunde gelegte Vorstellung vom Quellungsvorgang und von der Quellbarkeit der Preglschen Präparate berechtigt ist.

6. *Zustandsänderungen der Systemflüssigkeit*: Da wir es beim Serum mit einem Polydispersoid zu tun haben und auch die Trypsinlösung kolloid verteilten Stoff enthält, besteht die Möglichkeit, daß während eines länger dauernden Versuches die Systemflüssigkeit spontanen Zustandsänderungen unterliegt; solche können deshalb von Bedeutung sein, da das Brechungsvermögen eines Dispersoids u. a. von der Teilchengröße der dispersen Phase abhängt[1]). Es ist darum angezeigt, bei den Abbauversuchen als Kontrollprobe die Systemflüssigkeit ohne Substrat mitlaufen zu lassen. In den Versuchen mit 0,1 proz. Trypsinlösung ergaben die Kontrollen, die 24 Stunden unter den gleichen Bedingungen wie die Abbauproben gehalten wurden, keine die Fehlergrenze der Bestimmung überschreitenden n_D-Änderungen. Beim Serum kommen zwar unbedeutende, aber doch über der Fehlergrenze liegende n_D-Änderungen öfters vor, und zwar ergaben sich zwischen den n_D-Werten des Serums am Anfang (n_{D_1}) und am Ende (n_{D_2}) von 24stündigen Versuchen bei Zimmertemperatur normalerweise Differenzen wie die folgenden:

[1]) Siehe *G. Wiegner*, Kolloid-Zeitschr. **20**, 7. 1917.

Tabelle XXVI.

Serum		$n_{D_2} - n_{D_1}$
Normalserum ♂	I	+0,00002
	II	−0,00004
	III	−0,00007
	IV	+0,00002
	V	−0,00003
Schwangerenserum	VI	+0,00005
	VII	−0,00004
	VIII	+0,00004
	IX	+0,00002
	X	−0,00001

Diese n_D-Änderungen dürften wohl mit Zustandsänderungen der Serumkolloide zusammenhängen, da sie trotz aller Vorsichtsmaßregeln bezüglich guten Verschlusses der Gefäße, möglichster Asepsis und gleichmäßigen Ablesens vorkommen. *Man wird daher bei Versuchen mit Serum aus n_D-Änderungen, deren Betrag 10 Einheiten der 5. Dezimale nicht überschreitet, noch keine Rückbeschlüsse auf eine Fermentwirkung machen dürfen.*

7. Es ist offensichtlich, daß *Bakterienwachstum* sehr verschiedene Veränderungen des Mediums nach sich ziehen kann, insbesondere auch Konzentrationsänderungen, sei es durch Entnahme von Nährmaterial aus der Systemflüssigkeit oder durch Abgabe von Stoffwechselprodukten; andererseits kann es auch dadurch zur Fehlerquelle werden, daß das Substrat durch Fermentwirkungen gelöst wird, die mit den Bakterien, nicht aber mit dem Ferment zusammenhängen, das man zu untersuchen beabsichtigt. Möglichst aseptisches Arbeiten ist daher geboten. Man fügt darum, wie *Pregl* und *de Crinis* es vorschreiben, die als Quellungsmittel benützte Kochsalzlösung siedend zu dem schon im Versuchsgläschen befindlichen Substrat hinzu; außerdem bringe ich das Gläschen samt Inhalt dann noch für eine halbe Stunde auf ein Wasserbad von ca. + 95° C.

Sehr bequem ist es, sich beim Zusetzen der siedenden Kochsalzlösung eines Glaskolbens zu bedienen, der fest verschlossen und mit einem entsprechenden Steigrohr versehen, wenn man die Kochsalzlösung in ihm zum Sieden erhitzt, wie ein Heronsball wirkt, und durch das außen umgebogene und zu einer Spitze ausgezogene Steigrohr einen dünnen Flüssigkeitsstrahl austreten läßt. Das Absaugen der Kochsalzlösung, der Zusatz der Systemflüssigkeit und die Probeentnahme geschieht mit sterilisierten Pipetten. Serum, wenn solches als Systemflüssigkeit zur Verwendung kommt, wird unter aseptischen Kautelen gewonnen; dagegen läßt sich eine streng sterile Fermentlösung nicht herstellen. Ich habe aber bei unseren Versuchen mit Trypsinlösung keine Fehler beobachtet, für die ein Bakterienwachstum verantwortlich zu machen wäre. Vom Zusatz eines Thymolkrystalles, wie ihn *Pregl* und *de Crinis* empfehlen, habe ich abgesehen und beschränke mich auf die oben angeführten Maßnahmen, die für meine Versuchsbedingungen (Bruttemperatur bei 1—2 Stunden Versuchszeit, Zimmertemperatur bei längerer Versuchszeit) meiner Erfahrung nach zum Vermeiden störenden Bakterienwachstums genügen.

Damit sind jene Fehlerquellen erledigt, die deswegen von besonderer Wichtigkeit sind, weil sie bei nicht genügender Beachtung ihrer Art nach dazu geeignet wären, eine nicht stattgehabte Fermentwirkung vorzutäuschen bzw. eine solche ganz oder teilweise zu verschleiern[1]).

[1]) Hierher gehört auch die im folgenden Punkt 8 behandelte Abbaufähigkeit der Substrate, insofern sie die Voraussetzung für die Nachweisbarkeit einer Fermentwirkung mit einem bestimmten Substrat ist.

Es folgt nunmehr die Besprechung jener Faktoren, von denen die *Abbaugröße* bzw. die *Größe* der Ausschläge abhängt, mit denen die Methode eine stattgehabte Fermentwirkung anzeigt:

8. *Abbaufähigkeit des Substrates.* Um als Substrat für den Fermentversuch tauglich zu sein, muß das Trockenprotein in den angewendeten Lösungsmitteln sich spontan so wenig und unter der Einwirkung des Fermentes so stark lösen, daß die durch die spontane Löslichkeit bedingte n_D-Zunahme vernachlässigt werden kann gegenüber der bei der fermentativen Lösung des Substrates eintretenden n_D-Zunahme. Daß die nach der *Pregl*schen Vorschrift hergestellten Trockenproteine diese Eigenschaft besitzen, zeigt der folgende Versuch:

Versuch: Alle Versuchsgläschen sind mit der gleichen Menge gequollenem Substrat beschickt (Trockengewicht 0,01 g); dazu enthalten die mit a bezeichneten Gläschen, je 0,5 ccm einer Trypsinlösung in 0,86 proz. NaCl-Lösung mit $^1/_{1000}$Normalgehalt an Soda, die mit b bezeichneten Gläschen 0,5 ccm derselben Kochsalzlösung mit dem gleichen Sodagehalt.

Am Beginn (n_{D_1}) und am Ende der Versuchszeit (n_{D_2}) wurde der Brechungsindex der Systemflüssigkeit bestimmt.

Versuchszeit: Bei den Trypsinversuchen 13, bei den Kochsalzkontrollen 24 Stunden.

Versuchstemperatur: + 20 C°.

Ausführung des Versuches nach Zeiteinteilung I (siehe S. 458).

Tabelle XXVII.

		Substrate	n_{D_1}	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$
I	a	Plac. I	1,33527	1,33675	+0,00148
	b		1,33497	1,33499	+0,00002
II	a	Plac. II	1,33528	1,33666	+0,00138
	b		1,33497	1,33501	+0,00004
III	a	Plac. III	1,33530	1,33678	+0,00148
	b		1,33497	1,33502	+0,00005
IV	a	Pf.-Ser.	1,33524	1,33682	+0,00158
	b		1,33498	1,33501	+0,00003
V	a	R.-Ser.	1,33522	1,33679	+0,00157
	b		1,33499	1,33501	+0,00002

Bezüglich des Besitzes dieser Eigenschaft bei anderen Versuchstemperaturen und Versuchszeiten verweise ich auf die Löslichkeitsversuche S. 435 Tabelle XI und die noch folgenden Fermentversuche.

Die *Vergleichbarkeit der Resultate* wird davon abhängen:

a) Ob verschiedene Portionen eines auf einmal hergestellten Trockenproteins unter gleichen Umständen gleich stark vom Ferment aufgelöst werden und

b) ob die Abbaufähigkeit des Präparates durch längere Zeit hindurch unverändert bleibt.

ad a) Inwieweit die erste Vorbedingung erfüllt ist, geht daraus hervor, daß bei meiner endgültigen Versuchsanordnung die Ausschläge der unter gleichen Umständen mit einem Substrat angestellten Versuche innerhalb der Fehlergrenze von $\pm$ 0,00005 übereinstimmen[1]).

[1]) Siehe die Fehlergrenzenversuche S. 427; die Übereinstimmung innerhalb dieser Fehlergrenze nehmen wir im folgenden als Kriterium für genügende Konstanz der in Betracht kommenden Faktoren.

ad b) Meine Erfahrung bezüglich der Haltbarkeit der Trockenproteine erstreckt sich auf einen Zeitraum von 18 Monaten und die Präparate Placenta I und Trocken-Pferdeserum; die Abbaufähigkeit dieser beiden Präparate hat sich in der angegebenen Zeit nicht merklich geändert, obwohl sie nur lufttrocken und in einfach verschlossenen Eprouvetten ohne die Vorsichtsmaßregeln aufbewahrt worden waren wie *Hirsch*[1]) sie empfiehlt. Jedenfalls ist es aber, wenn zeitlich weiter auseinanderliegende Versuchsergebnisse verglichen werden sollen, angezeigt, sich durch einen unter leicht reproduzierbaren Bedingungen angestellten Kontrollversuch zu überzeugen, ob die Substrate noch gleich abbaufähig sind.

9. *Substratmenge.* Ich wiege die zur Beschickung bestimmte Substratmenge auf der analytischen Wage und zwar bei einer absoluten Menge von 0,01 g auf $\pm$0,001 g genau. Größere Genauigkeit der Einwage hätte keinen Sinn, da gelegentliche kleine Substratverluste, trotz aller Vorsicht, beim Absaugen des Quellungsmittels unvermeidlich sind.

Von einer quantitativen Untersuchung des Einflusses der Anfangsmenge des Substrates konnte für meine Zwecke abgesehen werden, da die Konstanterhaltung dieses Faktors nicht weiter steigerungsfähig war und die eventuell durch geringe Abweichungen bedingten Fehler mit eingehen in den Fehler der Fehlergrenzenversuche.

10. *Korngröße des Substrates.* Nicht ausgeschlossen, ja sogar wahrscheinlich war es, daß die Korngröße des Substrates von Einfluß auf die Abbaugröße sei. Man hat die Korngröße innerhalb bestimmter Grenzen in der Hand, da man die Substrate, die nach dem Trocknen mit Alkohol und Äther meist bis etwa grießkorngroße Krümeln enthalten, in der Reibschale bis zu verschiedenem Feinheitsgrade zerreiben kann; je mehr man das Substratpulver zerreibt, um so größer wird die äußere Oberfläche, die es dem Ferment zum Angriff bietet. Um zu sehen, ob durch Verwenden sehr fein zerriebenen Substrates die Abbaugröße gesteigert werden könne, stellte ich folgenden Versuch an:

Versuch: Je 0,01 g Substrat in die Versuchsgläschen eingewogen, siedende Kochsalzlösung zugesetzt, 30 Minuten am Wasserbad und 30 Minuten bei Zimmertemperatur quellen lassen; Kochsalzlösung abgesaugt und je 1 ccm 0,1 proz. Trypsinlösung zugesetzt. Nach 10 Minuten Mischens erste n_D-Bestimmung (n_{D_1}). Nun die Gläschen wohlverschlossen bei $+37°$ C liegen lassen; nach 1 Stunde 15 Minuten neuerliche n_D-Bestimmung (n_{D_2}).

Substrat: Placenta I und zwar bei I und II von etwa Grießkorngröße, bei III und IV zu einem mehlfeinen Pulver zerrieben.

Tabelle XXVIII.

	Substrat	n_{D_1}	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$
I	Plac. I .	1,33502	1,33552	+0,00050
II	grob .	1,33497	1,33553	+0,00056
III	Plac. I .	1,33493	1,33548	+0,00055
IV	fein . .	1,33493	1,33543	+0,00050

Man sieht, daß in beiden Fällen die n_D-Zunahmen von gleicher Größenordnung sind, sich also die Ausschläge durch das Zerreiben des Substrates nicht steigern ließen. Diese Unabhängigkeit der Abbaugröße von der Korngröße des Substrates innerhalb des untersuchten Bereiches mag darauf beruhen, daß durch die Quellung die innere Oberfläche der Substratpartikeln erschlossen und daß das Substrat

[1]) a. a. O.

bei dem angewendeten Mengenverhältnis im Überschuß vorhanden ist. Es hat sich mir als zweckmäßig erwiesen, das Substrat in nicht allzu fein geriebener Form zu verwenden, da die Verluste beim Absaugen der Kochsalzlösung um so schwerer vermeidbar werden, je kleiner die Substratteilchen sind.

11. *Quellungszustand des Substrates.* Daß der Quellungszustand des Substrates von Einfluß auf dessen fermentativen Abbau sein kann, ist bekannt. Durch Verwenden der Substrate im gleichen (für unsere Quellungsmittel praktisch maximalen) Quellungszustand ist dieser Faktor als Variable, die die Ausschläge der Methode beeinflussen könnte, ausgeschaltet.

12. *Menge des flüssigen Anteiles des Systems.* Da die n_D-Änderungen eine Funktion der Konzentrationszunahme sind, welche der flüssige Anteil des Reaktionssystems dadurch erfährt, daß ein Teil des Substrates in Lösung geht, müssen sie bei gleicher Abbaugröße abhängig sein vom Flüssigkeitsvolumen, über das sich die gelöste Substratmenge verteilt, und zwar wird der Sinn dieser Abhängigkeit so sein, daß die gleiche Menge gelösten Substrates sich in um so größeren n_D-Zunahmen ausdrücken wird, je kleiner das zur Verfügung stehende Lösungsvolumen ist.

Ein Beispiel mag dies belegen:

Versuchsausführung wie Versuch S. 454 Tabelle XXVIII.

Substrat: Je 0,01 g Placenta I.

Fermentlösung: 0,1 proz. Trypsinlösung.

Menge der zugesetzten Fermentlösung bei I und II je 1 ccm, bei III und IV je 0,5 ccm

Tabelle XXIX.

	Lösungs-volumen ccm	n_{D_1}	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$
I	1	1,33496	1,33563	+0,00067
II		1,33497	1,33567	+0,00070
III	0,5	1,33493	1,33611	+0,00118
IV		1,33495	1,33615	+0,00120

Aus dieser Abhängigkeit der n_D-Zunahmen von der Menge der Systemflüssigkeit ergibt sich, daß man vergleichbare Resultate nur erreichen kann, wenn man mit genau abgemessenen Flüssigkeitsmengen arbeitet. Die Notwendigkeit, daß Lösungsvolumen möglichst konstant zu erhalten, verlangt es, daß man auch die zur ersten n_D-Bestimmung dem Gläschen entnommene Flüssigkeitsprobe berücksichtige: Wenn daher das Lösungsvolumen (abgesehen von der Benetzungsflüssigkeit) z. B. 0,5 ccm betragen soll, beschicke ich das Gläschen zunächst mit 0,55 ccm von der Fermentlösung oder dem Serum mittelst einer in 0,01 ccm geteilten Pipette und entnehme ihm dann nach dem Mischen zur ersten n_D-Bestimmung eine Probe von 0,05 ccm, wozu ich eine Mikropipette mit einer Teilung in 0,001 ccm benütze.

Eine Überschlagsrechnung, bei der man die n_D-Zunahme unter sonst gleichen Umständen angenähert verkehrt proportional dem Volumen des flüssigen Systemanteiles setzen kann, zeigt, daß im Falle sich bei 0,5 ccm Lösungsvolum eine n_D-Zunahme von 0,00100 ergäbe, diese um + 0,00010 von ihrem ursprünglichen Wert abweichen muß, wenn sich das Lösungsvolum um +0,05 ccm ändert. Da nun, wie wir im vorigen Abschnitt gesehen haben[1]), die zu dem abgemessenen Flüssigkeitsvolumen hinzukommende Benetzungsflüssigkeit ungefähr zwischen 0,01—0,04 ccm schwankt, wird dies nicht ohne Einfluß auf die Versuchsergebnisse bleiben können[2]); diese

[1]) Siehe S. 446 Tabelle XX und S. 451 Tabelle XXV.

[2]) Vgl. S. 443.

nicht zu vermeidende Fehlerquelle dürfte vor allem dafür verantwortlich zu machen sein, daß auch für den mit allen Vorsichtsmaßregeln ausgeführten Fermentversuch als Fehlergrenze $\pm$ 0,00005 gesetzt werden muß

Offensichtlich besteht die Möglichkeit, die Ausschläge, mit denen die Methode die Auflösung einer bestimmten Substratmenge anzeigt, durch Verminderung des Lösungsvolumens zu vergrößern und damit scheinbar die Empfindlichkeit der Methode zu steigern; unter 0,5 ccm bin ich jedoch nicht heruntergegangen, da andererseits mit abnehmendem Flüssigkeitsvolumen der Einfluß der in gleicher Menge hinzukommenden Benetzungsflüssigkeit um so mehr hervortritt: Nehmen wir z. B. an, daß man imstande ist, das Lösungsvolumen innerhalb einer Grenze von $\pm$ 0,025 ccm konstant zu erhalten und etwa wieder, daß bei 0,5 ccm Lösungsvolum die n_D-Zunahme 0,00100 betrüge, so ergibt die Rechnung folgende Werte für die absoluten und prozentualen Fehler des Resultates bei verschiedenen Lösungsvolumina:

Tabelle XXX.

Lösungsvolumen ccm	$n_{D_2} - n_{D_1}$	absol. Fehler	proz. Fehler %
1 $\pm$ 0,025	0,00050	$\pm$ 0,0000125	2,5
0,5 $\pm$ 0,025	0,00100	$\pm$ 0,00005	5
0,25 $\pm$ 0,025	0,00200	$\pm$ 0,00020	10

Dabei haben wir zur Vereinfachung die Annahme gemacht, daß die gelöste Substratmenge unabhängig ist vom Lösungsvolumen; tatsächlich geht aber im kleineren Volumen cet. par. weniger Substrat in Lösung, was die rel. Fehler mit abnehmender Flüssigkeitsmenge noch rascher wachsen läßt. Natürlich gilt dasselbe, wie für die Benetzungsflüssigkeit auch für die anderen Fehlerquellen, die, wenn man auch den flüssigen Anteil des Reaktionssystems verkleinert, in gleichem Maße bestehen bleiben.

Es sei hier darum ausdrücklich betont, daß alle unsere Angaben über die Größenordnung der bei der Methode möglichen Fehler nur gelten für eine Menge der Systemflüssigkeit von 0,5 ccm bei einer Substratmenge von 0,01 g.

13. *Beschaffenheit des Mediums.* Die Forschungen über die Wirkungsbedingungen der Fermente haben gelehrt, daß die Fermentwirkungen von der Reaktion des Mediums, wie auch unter Umständen von der Konzentration anwesender Neutralsalze abhängen; auch die Viscosität des Mediums kann besonders bei makroheterogenen Systemen von Einfluß sein. Bei der Untersuchung der Fehlergrenzen der Methode ergibt sich die Gleichheit dieser Faktoren von selbst, wenn man zu den einzelnen Abbauversuchen ein und dieselbe Fermentlösung nimmt. Auch hier ist an die Benetzungsflüssigkeit als Fehlerquelle zu denken; ihr Einfluß ist aber in diesem Falle im Vergleich zu dem unter 12. behandelten zu vernachlässigen und kann, wenn man mit der Systemflüssigkeit vor der endgültigen Beschickung in der S. 448 geschilderten Weise einmal wäscht, ganz ausgeschaltet werden.

Je nach der Fragestellung kann man die Reaktion des Mediums in verschiedener Weise bestimmen: Soll der Fermentprozeß bei *bekannter* und *konstanter* Wasserstoffionenkonzentration einhergehen, so wird man ein entsprechendes Puffergemisch anwenden; handelt es sich nur um das Herstellen *gleicher Anfangsbedingungen*, so genügt der Zusatz einer bestimmten Säure- bzw. Alkalimenge zur Fermentlösung. Das Medium meiner Trypsinversuche war eine physiologische Kochsalzlösung mit $^1/_{1000}$ Normalgehalt an Soda.

14. Für die *Fermentkonzentration* kommt, wenn man mit einer vorgegebenen Lösung arbeitet, wieder nur die Benetzungsflüssigkeit als Fehlerquelle in Betracht[1]); daß sie jedoch auch hier nicht von wesentlichem Einfluß auf das Versuchsergebnis sein kann, ersieht man aus der S. 469 wiedergegebenen Kurve, welche die Abhängigkeit der n_D-Zunahmen von der Fermentkonzentration angibt, wobei ich hier unter „Ferment"-Konzentration: Gehalt einer Lösung an Ferment*präparat* verstehe[2]) Soll die Benetzungsflüssigkeit ganz ohne Einfluß auf die Fermentkonzentration bleiben, so kann man die Kochsalzlösung durch Waschen vor der endgültigen Beschickung beseitigen.

Da die Fermentpräparate stark hygroskopisch sind, müssen sie, wenn eine Lösung bestimmter Konzentration wiederhergestellt werden soll, vor dem Wiegen im Exsiccator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet werden. Trotzdem will die Bereitung von Fermentlösungen gleicher Wirksamkeit oft nur schwer gelingen, was

15. mit dem veränderlichen *Zustand der Fermentlösung* zusammenhängt.

Es handelt sich dabei um die bei Fermenten allgemeine Erscheinung des Alterns; sie geht mit einer Abnahme der Aktivität einher und zwar im allgemeinen um so rascher, je höher die Temperatur ist. Man darf daher, wenn Fermentlösungen zur Zeit des Versuches gleiche Wirksamkeit haben sollen, die seit der Herstellung der Lösung verflossene Zeit, sowie die Temperatur, bei der man sie aufbewahrt, nur in engen Grenzen schwanken lassen; andernfalls beobachtet man meist erhebliche Abweichungen zwischen den Versuchsergebnissen. Das Altern der Fermentlösung kann sich bei Zimmertemperatur schon in wenigen Stunden bemerkbar machen, so daß man eine Fermentlösung kühl (Eisschrank) aufbewahren muß, wenn sie für Versuche, die mehrere Stunden auseinanderliegen, gleich wirksam bleiben soll.

16. *Die Temperatur*, bei der man den Fermentprozeß vor sich gehen läßt, ist, wie bekannt, von wesentlichem Einfluß auf seine Geschwindigkeit. Das Wirkungsoptimum für von Warmblütern stammenden Fermente liegt meist um + 37° C. Wie ich aber schon S. 452 erwähnt habe, ist es bei einer Versuchstemperatur von + 37° C nicht angezeigt, den Versuch länger als 2 Stunden laufen zu lassen; ich habe bei längerer Versuchsdauer öfters grobe Fehler beobachtet, die offenbar mit Bakterienwachstum zusammenhängen. Es ist daher unter Umständen günstiger, bei etwa + 20° C zu arbeiten und dafür die Versuchsdauer auszudehnen.

Ich halte die Versuchstemperatur innerhalb ± 0,5° C konstant, was sich für meine Versuchsbedingungen als genügend erwies; ein Thermostat, wie er für bakteriologische Zwecke verwendet wird, mit einem einfachen Toluolregulator entsprach also allen Anforderungen.

17. *Zeit.* Als wesentliche Bedingung gut übereinstimmender Resultate erwies sich die genaueste Einhaltung aller zeitlicher Verhältnisse: Erst nachdem ich nicht nur die eigentliche Versuchszeit (vom Einbringen des Versuchsgläschens in den Thermostaten bis zum Herausnehmen), sondern auch die notwendigen zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Handgriffen, wie Zusatz der Fermentlösung zum Substrat, Probeentnahme usw. ganz genau einzuhalten gelernt hatte, kam ich zu einer Übereinstimmung der Ausschläge bis auf ± 0,00005. Die größeren Abweichungen, die besonders beim Arbeiten mit stark wirksamen Fermentlösungen gleich auftraten, wenn weniger genau auf alle zeitlichen Abstände geachtet wurde, hängen offenbar damit zusammen, daß die schon während des nach dem Fermentzusatz notwendigen Mischens bzw. schon während des Waschens beginnende Fermentwirkung im Augenblick der Probeentnahme nicht gleich weit fortgeschritten

[1]) Vgl. S. 443.

[2]) Die Prozente bedeuten Gramme des Fermentpräparates in 100 ccm der fertigen Lösung.

Fortsetzung auf S. 460.

Zeiteinteilung I.

(Für Versuche ohne Waschen der gequollenen Substrate mit der Fermentlösung bezw. dem Saum.)

I.

$(n-1)^h$ 54 Kochsalzlösung absaugen
56 Zusatz der Fermentlösung
n^h 01 } mischen
02—04 Zentrifugieren
05—06 Probeentnahme; Beschickung d. Refraktom.
n^h 08 Versuchsgläschen in den Thermostaten

n^h 26—28 1. Ablesung (Reinigen des Refraktometers)

II.

n^h 24 Kochsalzlösung absaugen
26 Zusatz der Fermentlösung
31 } mischen
32—34 Zentrifugieren
35—36 Probeentnahme; Beschickung des Refraktom.
n^h 38 Versuchsgläschen in den Thermostaten

n^h 56—58 1. Ablesung (Reinigen des Refraktometers)

III.

n^h 54 Kochsalzlösung absaugen
56 Zusatz der Fermentlösung
$(n+1)^h$ 01 } mischen
02—04 Zentrifugieren
05—06 Probeentnahme; Beschickung d. Refraktom.
$(n+1)^h$ 08 Versuchsgläschen in den Thermostaten

$(n+1)^h$ 26—28 1. Ablesung (Reinigen des Refraktometers)

IV.

$(n+1)^h$ 24 Kochsalzlösung absaugen
26 Zusatz der Fermentlösung
31 } mischen
32—34 Zentrifugieren
35—36 Probeentnahme; Beschickung d. Refraktom
$(n+1)^h$ 38 Versuchsgläschen in den Thermostaten

m^h 08 Versuchsgläschen aus dem Thermostaten 09—11 Zentrifugieren 12—13 Probeentnahme; Beschickung des Refraktom.			
m^h 33—35 2. Ablesung (Reinigen des Refraktometers)			
	m^h 38 Versuchsgläschen aus dem Thermostaten 39—41 Zentrifugieren 42—43 Probeentnahme; Beschickung d. Refraktom.		
	$(m+1)^h$ 03—05 2. Ablesung (Reinigen des Refraktometers)		
		$(m+1)^h$ 08 Versuchsgläschen aus dem Thermostaten 09—11 Zentrifugieren 12—13 Probeentnahme; Beschickung d. Refraktom.	
		$(m+1)^h$ 33—35 2. Ablesung (Reinigen des Refraktometers)	
			$(m+1)^h$ 38 Versuchsgläschen aus dem Thermostaten 39—41 Zentrifugieren 42—43 Probeentnahme; Beschickung d. Refaktom.
			$(m+2)^h$ 03—05 2. Ablesung (Reinigen des Refaktometers)

Zeiteinteilung II.

(Für Versuche mit einmaligem Waschen vor der endgültigen Beschickung.)

I.	II.
$(n-1)^h$ 48 Kochsalzlösung absaugen	
50 1. Zusatz der Fermentlösung	
50–55 } mischen	
56—58 Zentrifugieren; Absaugen der Waschflüssigkeit	
n^h 00 2. Zusatz der Fermentlösung; schütteln	
02—04 Zentrifugieren	
05—06 Probeentnahme; Beschickung des Refraktometers	
n^h 08 Versuchsgläschen in den Thermostaten	
	n^h 18 Kochsalzlösung absaugen
	20 1. Zusatz der Fermentlösung;
	20–25 } mischen
n^h 26—28 1. Ablesung	26—28 Zentrifugieren; Absaugen der Waschflüssigkeit
	30 2. Zusatz der Fermentlösung; schütteln
(Reinigen des Refraktometers)	32—34 Zentrifugieren
	35—36 Probeentnahme; Beschikkung des Refraktometers
	n^h 38 Versuchsgläschen in den Thermostaten usw.

ist; ebenso wird nicht der gleiche Endpunkt erfaßt, wenn man sich beim Abbruch des Versuches mit dem Zentrifugieren, der Probeentnahme usw. verschieden lang aufhält.

Um diese sonst unvermeidlichen Abweichungen auszuschalten, arbeite ich nach einer Zeiteinteilung, die, je nachdem man das Substrat vor dem endgültigen Beschicken mit der Fermentlösung bzw. dem Serum wäscht oder nicht[1]), etwas verschiedene Form annehmen mußte.

Die Zeiteinteilungen sind von dem Gesichtspunkt ausgearbeitet, daß unter Einhalten der gebotenen Temperier- und Mischzeiten die einzelnen Versuche mit möglichster Ausnützung der Zeit einander folgen können[2]), wobei für jeden Handgriff soviel Zeit gerechnet ist, daß er ohne Hast ausgeführt werden kann. Ich habe, da die Einhaltung bestimmter Zeitabstände sich einmal als notwendig erwiesen hatte, das Arbeiten nach der Zeiteinteilung nie als Komplikation, sondern als Erleichterung empfunden, da sich die ohnedies notwendigen Handgriffe, wenn man sie immer in gleicher Weise ausführt, ganz zwanglos so aneinanderreihen, wie die Zeiteinteilungen es angeben.

---

[1]) Vgl. S. 447.

[2]) Nur wenn die Versuchszeit ($m-n$) kürzer als 2 Stunden sein soll, ist der fortlaufende Turnus gestört; in diesem Falle muß man die Versuchsreihe teilen und kann den Versuch III erst nach der 2. Ablesung des Versuchs II anschließen.

18. *Mischungsbedingungen*: Da beim makroheterogenen System die Geschwindigkeit, mit der die Lösungsprodukte aus der Umgebung des noch zu lösenden Substrates weggeschafft werden, bzw. das Fermentanes herantritt, eine wesentliche Rolle spielen konnte, stellte ich die Versuche teils so an, daß die beschickten Versuchsgläschen während der Versuchszeit ruhig lagen, zum anderen Teil kamen die Gläschen auf den Mischer, der während des ganzen Versuches in langsamem (3—5 Umdrehungen in der Minute) Gang gehalten wurde. Es zeigte sich, daß langdauernde Versuche bei Zimmertemperatur nur dann befriedigende Übereinstimmung der Resultate ergeben, wenn man den Mischer anwendet (vgl. S. 447 Tabelle XXI, Versuch *C*—*F*). Für die Versuche mit kurzer Versuchszeit bei Bruttemperatur erwies er sich als entbehrlich.

Das Bisherige zusammenfassend will ich nun *die* ***Ausführung der Methode,*** wie sie sich aus der Untersuchung der Fehlerquellen ergab, ***kurz beschreiben:***

(Die eingeklammerten Seitenzahlen beziehen sich auf die Stellen im Text, an denen die hier nur angeführten Einzelheiten ausführlich beschrieben und begründet wurden.)

Das als Substrat benützte Trockenprotein wird auf seine spontane Löslichkeit geprüft durch refraktometrische Untersuchung des Kochwassers (S. 434), sowie Prüfung in der Systemflüssigkeit minus Ferment unter den Bedingungen des Fermentversuches (S. 432) und für tauglich gehalten, wenn 0,01 g Substrat in 0,5 ccm Flüssigkeit eine n_D-Zunahme von höchstens 0,00005 bewirkt.

Zum Versuch wiege ich 0,01 g Substrat, lufttrocken auf $\pm$0,001 g genau ab und bringe es in ein gereinigtes (S. 433) und getrocknetes Versuchsgläschen (S. 433). Nun wird dieses mittels einer Spritzvorrichtung (S. 452) mit siedender physiologischer Kochsalzlösung voll gefüllt und auch der Glasstoppel zwecks Sterilisierung mit der siedenden Kochsalzlösung abgespritzt. Leicht verschlossen kommt das Versuchsgläschen nun für eine halbe Stunde auf das Wasserbad (ca. +95° C) und bleibt dann noch mindestens ebensolange bei Zimmertemperatur stehen. Die weiteren Handgriffe geschehen nun in genau bestimmten zeitlichen Abständen nach einer Zeiteinteilung:

a) Bei Versuchen ohne Waschen des gequollenen Substrates mit der Fermentlösung bzw. dem Serum nach Zeiteinteilung I (S. 458):

Von dem praktisch maximal gequollenen Substrat wird die Kochsalzlösung möglichst vollständig und unter möglichstem Vermeiden von Substratverlusten nach kurzem Zentrifugieren abgesaugt (S. 443) und nun werden 0,55 ccm Fermentlösung bzw. Serum zugesetzt. Dann kommt das so beschickte Gläschen in seinem Halter (S. 433) auf den Mischer (S. 447). Nach 5 Minuten Mischens mit ca. 15—17 Umdrehungen in der Minute wird kurz zentrifugiert oder man läßt das Substrat sich einfach absetzen und dann erfolgt die Probeentnahme zur ersten n_D-Bestimmung. Bei diesem Verfahren ist die zugesetzte Fermentlösung bzw. das Serum durch 0,01—0,04 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

b) Bei Versuchen mit einmaligem Waschen vor der endgültigen Beschickung nach Zeiteinteilung II (S. 460):

Nach dem Absaugen der Kochsalzlösung wird 0,5—1 ccm Fermentlösung bzw. Serum zugesetzt, 5 Minuten gemischt, dann, nachdem sich das Substrat gesenkt hat oder zu Boden zentrifugiert wurde, diese „Waschflüssigkeit" abgesaugt und verworfen. Nun erst wird das Gläschen endgültig beschickt wie früher, dann wird umgeschüttelt und nach dem Absetzen des Substrates oder kurzem Zentrifugieren die Probe zur ersten Bestimmung entnommen.

Und zwar entnehme ich dem beschickten Gläschen eine abgemessene Flüssig-

keitsprobe von 0,05 ccm, so daß 0,5 + (0,025 ± 0,015) ccm[1]) Systemflüssigkeit zurückbleibt. In der entnommenen Probe wird nun der Brechungsindex mittels des *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometers mit Hilfsprisma in der im Abschnitt Ia angegebenen Weise bestimmt. Hier sei nur kurz nochmals hervorgehoben, daß ich eine *Temperierzeit von 20 Minuten* einhalte und als endgültigen Wert das Mittel aus 10 wie S. 423 angegebenen Ablesungen nehme. Beim Arbeiten mit *Serum* nehme ich die erste und die zweite n_D-Bestimmung bei *gleicher Spiegel- und Blendenstellung* vor. Gleich nach der Probeentnahme wurde das Versuchsgläschen sorgfältig verschlossen und nach Anbringen einer „Verdunstungsmarke" (S. 434) in seinem Halter befestigt; bei einer auf ±0,5° C bestimmten Versuchstemperatur wird es dann während einer Versuchszeit $m-n$ entweder ruhig horizontal hingelegt oder mittels des Mischers langsam bewegt (3—5 Umdrehungen in der Minute). Bei einer Versuchstemperatur von +37° C dehnte ich die Versuchsdauer höchstens auf 2, bei Zimmertemperatur bis zu 24 Stunden aus. Nach Ablauf der Versuchszeit wird zunächst die Verdunstungsmarke kontrolliert und wenn bei Bruttemperatur gearbeitet wurde, das Gläschen unter dem Strahl der Wasserleitung rasch abgekühlt. Nach dem Absetzen des Substrates oder kurzem Zentrifugieren nimmt man die zweite n_D-Bestimmung in einer zweiten kleinen Flüssigkeitsprobe vor.

Aus der Diskussion der Fehlerquellen ergab sich, daß man unter diesen Voraussetzungen von n_D-Zunahmen über 0,00010 angefangen auf eine fermentative Auflösung des Substrates schließen darf.

Fehler des Fermentversuches.

Es folgen nun einige mit dieser Methodik ausgeführte Versuche, wie ich sie zur Ermittelung der Genauigkeit des Verfahrens angestellt habe, und zwar sei von mehreren Versuchen immer nur der mit der besten und der mit der schlechtesten Übereinstimmung der Resultate wiedergegeben:

Als Fermentlösung diente zu diesen Fehlerversuchen eine 0,1 proz. Trypsinlösung in physiologischer Kochsalzlösung mit einem Sodazusatz zu $^1/_{1000}$ Normalgehalt, als Substrat Plac. I.

(Bei den zeitlich oft weiter auseinanderliegenden Versuchen war zur Bereitung der Trypsinlösung die jeweils vorrätige physiologische Kochsalzlösung benützt worden, deren etwas wechselnde Konzentration schuld an den nicht übereinstimmenden Anfangs-n_D-Werten der Fermentlösungen ist. Daß die Mittelwerte der Ausschläge bei gleichartigen Versuchen voneinander abweichen, kommt daher, weil die Zeit vom Bereiten der Fermentlösung bis zum Versuchsbeginn nicht immer die gleiche war.) Die 4 Untersuchungen jedes Versuches sind unmittelbar hintereinander nach Zeiteinteilung I gemacht.

Zunächst sieht man bezüglich der Anwendung des Mischers, daß bei den längerdauernden Versuchen mit niederer Versuchstemperatur die Ausschläge unvergleichlich besser übereinstimmen, wenn man sich des Mischers bedient, als wenn man die Versuchsgläschen ruhig liegen läßt: Ich mache daher solche Versuche nie ohne Mischer. Die ohnedies gute Übereinstimmung bei den kurzdauernden Versuchen mit hoher Versuchstemperatur ließ sich durch Anwenden des Mischers nicht weiter verbessern.

Wir haben also mit einem mittleren Fehler der einzelnen Untersuchung von ±0,000014 bis ±0,000045 und größten Abweichungen vom wahrscheinlichsten Wert bis 0,00005 zu rechnen. Das gilt auch für Versuche nach Zeiteinteilung II.

[1]) Der eingeklammerte Anteil entspricht der Benetzungsflüssigkeit; vgl. S. 446 Tabelle XX und S. 451 Tabelle XXV.

Tabelle XXXI.

Versuch	Versuchs-temperatur °C	Versuchs-zeit: m n	Gebrauch des Mischers	Temperatur der n_D-Bestimmung °C	Unter-suchung	n_{D_1}	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$	Mittlere n_D-Zunahme	Mittlerer Fehler einer Untersuchung	Größte Abweichung vom Mittelwert
A	+39,5+0,5	1 Stunde 15 Min.	ohne Mischer	+17,5+0,05	I	1,33495	1,33618	+0,00123	+0,00120	+0,000045	0,00005
					II	1,33496	1,33615	+0,00119			
					III	1,33495	1,33620	+0,00125			
					IV	1,33494	1,33609	+0,00115			
B	+36,5+0,5	1 Stunde 15 Min.	ohne Mischer	+17,5+0,06	I	1,33488	1,33596	+0,00108	+0,00109	+0,000014	0,00002
					II	1,33487	1,33596	+0,00109			
					III	1,33486	1,33596	+0,00110			
					IV	1,33485	1,33596	+0,00111			
C	+20,0+0,5	6 Stunden	ohne Mischer	+17,5+0,05	I	1,33514	1,33609	+0,00095	+0,00086	+0,000109	0,00012
					II	1,33512	1,33586	+0,00074			
					III	1,33514	1,33609	+0,00095			
					IV	1,33511	1,33590	+0,00079			
D	+20,0+0,5	6 Stunden	m. Mischer	+17,5+0,04	I	1,33527	1,33639	+0,00112	Abweichung: bei I und II 0,00020		
					II	1,33524	1,33616	+0,00092			
			o. Mischer		III	1,33524	1,33638	+0,00114	bei III und IV 0,00001		
					IV	1,33524	1,33637	+0,00113			
E	+20,0+0,5	6 Stunden	mit Mischer	+17,5+0,03	I	1,33506	1,33610	+0,00104	+0,00105	+0,000035	0,00004
					II	1,33508	1,33615	+0,00107			
					III	1,33513	1,33614	+0,00101			
					IV	1,33512	1,33621	+0,00109			
F	+20,0+0,5	6 Stunden	mit Mischer	+17,5+0,05	I	1,33533	1,33656	+0,00123	+0,00124	+0,00002	0,00003
					II	1,33529	1,33653	+0,00124			
					III	1,33529	1,33652	+0,00123			
					IV	1,33529	1,33656	+0,00127			

Die eingangs gestellte Frage: Wie genau ist der zur Beobachtung gelangende Effekt definiert? ist somit dahin zu beantworten, daß die Ausschläge, mit denen die in der angegebenen Weise ausgeführte Methode eine Fermentwirkung unter gleichen Umständen anzeigt, innerhalb eines Fehlerbereiches von $+0{,}00005$ *übereinstimmen.*

II. Welche Wirkungsweise des Fermentes erfaßt die Methode?

Man könnte diese Frage zunächst vielleicht für trivial halten, da es ja ganz durchsichtig zu sein scheint, daß die beobachtete n_D-Zunahme eine Folge der Konzentrationszunahme ist, welche der flüssige Anteil des Reaktionssystems erfährt, wenn das Substrat in Lösung geht und daß man also die *Auflösung* des koagulierten Proteins beobachtet.

Die Frage ist aber nur im Versuch zu beantworten, weil auch das schon gelöste Substrat unter der fortdauernden Einwirkung des Fermentes Veränderungen unterliegt. Diese bestehen in chemischen Veränderungen, bei denen die hydrolytische Aufspaltung der Lösungsprodukte zu immer einfacheren Eiweißbausteinen vorherrschen, welcher Prozeß begleitet ist von verschiedenen physikalischen Zustandsänderungen, insbesondere von einer Zunahme des Dispersitätsgrades. Da der Brechungsindex nicht bloß von der Konzentration und Art der in Lösung befindlichen Atome abhängig ist, sondern unter Umständen die Bindungsweise der Atome im Molekül ihren Einfluß geltend machen kann, kann man molekulare Umsetzungen, wie sie beim Eiweißabbau vor sich gehen, nicht ohne weiteres vernachlässigen. So haben *Obermayer* und *Pick*[1]) gezeigt, daß gelöste Stoffe der Eiweißgruppe unter der Einwirkung von Fermenten ihren Brechungsindex ändern; insbesondere finden diese Autoren, daß bei der „Proteolyse“ im engeren Sinne (Pepsin) keine n_D-Änderungen auftreten; hat aber das Ferment auch eine „peptolytische“ Komponente (Trypsin), so nimmt der n_D mit fortschreitendem Eiweißabbau zu: Es gilt also nach *Obermayer* und *Pick* nur für die Produkte der Pepsinverdauung, daß der n_D des ungespaltenen Eiweißkörpers gleich ist dem n_D der Summe der Spaltprodukte; für die Produkte der tryptischen Verdauung ist er größer. Ich mußte also beim Arbeiten mit Trypsin auf das Zutagetreten der Abhängigkeit des n_D von der chemischen Konstitution gefaßt sein.

Ferner muß eine Beziehung bestehen, die bei gegebener Lichtwellenlänge den Brechungsindex mit der Teilchengröße verbindet[2]).

Ganz allgemein ist also die n_D-Zunahme ($\Delta\, n_D$) des flüssigen Anteiles unseres Systems eine Funktion von 3 Variabeln:

$$\Delta\, n_D = f(C; K; R) \tag{6}$$

nämlich von der Konzentration (C) des flüssigen Systemanteiles an Lösungsprodukten, dann einer mit der chemischen Konstitutionsänderung des schon Gelösten zusammenhängenden Größe (K) und der Teilchengröße (R). Nur wenn die Abhängigkeit von K und R gegenüber der von C zu vernachlässigen ist, d. h. innerhalb der Fehlergrenze des Versuches fällt, kann man statt (6) als Näherung schreiben:

$$\Delta\, n_D = f(C) \tag{7}$$

und sagen, daß die Methode die Auflösung und nur die Auflösung des Substrates zur Beobachtung bringt; anderenfalls ist eine beobachtete n_D-Zunahme durch die Abhängigkeit von den obigen 3 Variablen bestimmt, deren Einfluß nicht auseinanderzuhalten ist.

---

[1]) *Obermayer* und *Pick*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **7**, 331. 1906.

[2]) Vgl. *G. Wiegner*, Kolloid-Zeitschr. **20**, 7. 1917.

Mit welcher von diesen beiden Möglichkeiten zu rechnen sein würde, ließ sich nicht voraussagen, da dies von den besonderen Versuchsbedingungen[1]) und dem Bereich abhängen konnte, über das sich die Beobachtung erstreckt. Ich stellte daher zur Entscheidung dieser Frage die folgenden *Versuche* an:

1. 2,5 g[2]) Pepton e carne (Merck) wurde in physiologischer Kochsalzlösung zum Volumen von 50 ccm gelöst und der n_D der Lösung bestimmt; ferner wurde eine 0,2 proz. Trypsinlösung in physiologischer Kochsalzlösung mit einem Sodazusatz zu $^1/_{500}$ Normalgehalt bereitet und auch deren n_D bestimmt. Von diesen Lösungen wurden gleiche Teile gemischt und 20 Minuten später in kleinen Proben der n_D des Gemisches bestimmt (n_{D_1}). Nun blieben die Pepton-Trypsingemische 24 Stunden bei +20° C wohlverschlossen und lichtgeschützt stehen, worauf abermals ihr n_D bestimmt wurde (n_{D_2}).

Tabelle XXXII.

		n_{D_1}	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$
I	Trypsinlösung + Peptonlösung zu gleich. Teilen	1,33824	1,33820	−0,00004
II	Trypsinlösung + Peptonlösung zu gleich. Teilen	1,33821	1,33820	−0,00001
III	Trypsinlösung allein	1,33525	1,33524	−0,00001
IV	Peptonlösung allein	1,34116	1,34117	+0,00001

Brechungsindex des Gemisches aus den Anfangswerten von III und IV berechnet: 1,33820.

Es traten keine nennenswerten n_D-Änderungen, sicher keine n_D-Zunahmen ein. Solche sind auch für die ersten 20 Minuten (vor der ersten n_D-Bestimmung) auszuschließen, da sich aus den bekannten Brechungsindices der Pepton- und der Trypsinlösung nach der Formel (1) für den n_D der Gemische ein Sollwert von 1,33820 in Übereinstimmung mit den gefundenen Werten ergibt. Ein analoger Versuch von 2stündiger Dauer bei Bruttemperatur hatte das gleiche Ergebnis. Der Ausfall dieser Versuche gewinnt für die Methodik insofern Bedeutung, als bei *Obermayer* und *Pick* die n_D-Zunahmen, welche unter ihren Versuchsbedingungen bei tryptischer Verdauung von Peptonlösungen auftraten, um so größer wurden, je konzentriertere Peptonlösungen sie nahmen. Meine Peptonlösung hat nun einen um 0,00630 höheren n_D als das Lösungsmittel (physiologische Kochsalzlösung), während die durch die Lösungsprodukte der Substrate in meinem Versuchsbereich bewirkten n_D-Zunahmen höchstens 0,00150 betragen: Man kann also (ungefähr gleichen refraktometrischen Index des Pepton e carne und der Lösungsprodukte unserer Substrate vorausgesetzt) annehmen, daß auch die auf die Hälfte verdünnte Peptonlösung viel konzentrierter ist als die Lösung der Abbauprodukte des Substrates selbst am Ende eines Versuches; es ist also um so weniger

[1]) So konnte *Robertson*, Journ. of biol chem. **12**, 23. 1912, eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Trypsinwirkung, bei der die Menge des noch fällbaren Caseins refraktometrisch bestimmt wird, darauf gründen, daß sich bei einer Alkalinität von $80 \cdot 10^{-5}$ Äquivalenten Na auf 1 g Casein der n_D durch tryptische Verdauung nicht ändert (zit. nach *Oppenheimer*).

[2]) Die Peptonlösung war nicht ganz 5 proz., da sich ein kleiner Rest des Peptons nicht lösen wollte, von dem die Lösung vor dem Gebrauch durch Zentrifugieren befreit wurde.

zu erwarten, daß bei dieser Lösung geringerer Konzentration durch den weiteren Abbau des gelösten Substrates eine n_D-Zunahme bemerkbar werden sollte.

Indessen beantworten diese Versuche die Frage nicht zwingend, da sich ihr Ergebnis nur durch einen Analogieschluß auf meine Versuchsbedingungen übertragen läßt, weshalb ich noch einen zweiten *Versuchs*weg einschlug:

2. Es wurde ein gewöhnlicher Fermentversuch angesetzt, aber mit größeren absoluten Mengen und zwar mit 0,1 g Substrat und 5 ccm Trypsinlösung (wie sonst 0,1% Trypsin in physiologischer Kochsalzlösung mit einem Sodazusatz zu $^1/_{1000}$ Normalgehalt; Versuchstemperatur $+36°$ C; $m-n = 3$ Stunden. Dabei ergaben sich die n_D-Zunahmen: $n_{D_2} - n_{D_1}$. Nun wurde diese Systemflüssigkeit von dem noch ungelösten Substrat durch Zentrifugieren befreit, in andere Versuchsgläschen gebracht und wohlverschlossen weitere 24 Stunden bei $+20°$ C stehengelassen. Hierauf wurde wieder der n_D bestimmt und nachgesehen, ob er sich geändert habe: $n_{D_3} - n_{D_2}$. Da die Systemflüssigkeit am Ende der ersten Versuchsperiode neben dem Ferment Lösungsprodukte in allen Stadien des Abbaues also auch erste Abbaustufen enthalten mußte, erfaßt diese zweite Versuchsperiode jene Veränderungen allein, welche die Lösungsprodukte unter der fortdauernden Einwirkung des Fermentes erfahren und die sonst gleichzeitig mit dem Lösungsvorgang einhergehen. Voraussetzung ist natürlich, daß das Ferment in der zweiten Versuchsperiode noch wirksam ist; davon überzeugte ich mich, indem ich mit einem Teil der vom ersten Substrat befreiten Systemflüssigkeit einen zweiten Abbauversuch ansetzte: 0,5 ccm der Systemflüssigkeit wurden zu 0,01 g frischem Substrat in der gewöhnlichen Weise zugesetzt und im Versuchsgläschen bei $+20°$ C liegen gelassen; nach 16 Stunden wurde der n_D bestimmt (n_{D_4}).

Tabelle XXXIII.

Substrat	n_{D_1}	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$	n_{D_3}	$n_{D_3} - n_{D_2}$	n_{D_4}	$n_{D_4} - n_{D_2}$
I Plac. I	1,33513	1,33648	+0,00135	1,33647	−0,00001	1,33762	+0,00114
II Plac. II	1,33510	1,33667	+0,00157	1,33668	+0,00001	1,33760	+0,00093

Der Versuch zeigt eindeutig, daß der weitere Abbau der Lösungsprodukte, den man annehmen muß, da das Ferment in der zweiten Versuchsperiode noch stark wirksam war (beachte: $n_{D_4} - n_{D_2}$), ohne Einfluß auf den n_D der Systemflüssigkeit bleibt (siehe $n_{D_3} - n_{D_2}$), auch wenn diese mehr Lösungsprodukte enthält (siehe $n_{D_2} - n_{D_1}$) als die Systemflüssigkeit am Ende eines Fermentversuches unter den gewöhnlichen Bedingungen. Analoge Versuche mit kürzerer zweiter Versuchsperiode bei Bruttemperatur hatten das gleiche Ergebnis.

Es läßt sich also sagen: Unter den gegebenen Versuchsbedingungen und innerhalb eines Ausschlagbereiches bis $\Delta n_D = 0{,}00150$ *ist die* n_D*-Zunahme* ***nur*** *eine Funktion der gelösten Substrat****menge****. Die Methode bringt also ausschließlich und rein die fermentative* ***Lösung*** *der koagulierten Proteine zur Beobachtung, wogegen sich der Abbau der Lösungsprodukte der Beobachtung entzieht.*

III. Was für eine Funktion der gelösten Substratmenge ist die Zunahme des Brechungsindex?

Um aus einer beobachteten n_D-Zunahme (Δn_D), von der wir nun wissen, daß sie im vorliegenden Falle *nur* von der Konzentration (C) an Lösungsprodukten bedingt ist, einen quantitativen Rückschluß auf die gelöste Substratmenge ziehen zu können, müssen wir die Form der Funktion (7) bzw.

$$n_D = f(C) + k \qquad (8)$$

kennen.

Diese Beziehung zwischen der Konzentration einer Lösung und ihrem Brechungsindex ist im allgemeinen keine lineare; nur wenn für spez. Kombinationen von Gelöstem und Lösungsmittel gewisse Bedingungen (siehe S. 465 Anm. 1) zutreffen, läßt sie sich durch eine lineare Formel mit größerer oder kleinerer Genauigkeit approximieren. Da für eine Reihe von Eiweißkörpern in wässeriger, salzhaltiger Lösung gefunden wurde[1]), daß der n_D solcher Lösungen sehr angenähert proportional mit der Konzentration zunimmt, werden wir dies auch für die Lösungs- bzw. Abbauprodukte unserer Substrate erwarten. Immerhin war es doch notwendig, sich über den Grad dieser erwarteten Annäherung in unserem besonderen Fall durch den *Versuch* zu unterrichten.

Zu diesem Zweck stellte ich einen gewöhnlichen Fermentversuch, aber mit 1 g Substrat (Plac. I) und 50 ccm Trypsinlösung an (Versuchstemperatur $+37{,}5°$ C; $m - n = 1$ Stunde 15 Minuten). Nach dem Abbrechen des Versuches wurde die Systemflüssigkeit durch Filtrieren von dem restlichen Substrat befreit und von ihr unter allen gebotenen Vorsichtsmaßregeln eine Anzahl Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, deren Brechungsindices in der folgenden Tabelle zusammengestellt sind; die Konzentration (C) ist in Bruchteilen der Konzentration der unverdünnten Systemflüssigkeit angegeben, die gleich 1 gesetzt wurde.

Schreiben wir die erwartete lineare Beziehung zwischen n_D und C als

$$n_D = a \cdot C + k\,, \tag{9}$$

so ist a eine Maßkonstante und k der Brechungsindex des Lösungsmittels[2]).

Tabelle XXXIV.

C	n_D	$a = \frac{n_D - k}{C}$	k
1	1,33606	0,00133	1,33473
0,9	1,33594	0,00134	
0,75	1,33570	0,00129	
0,6	1,33552	0,00132	
0,5	1,33539	0,00132	
0,4	1,33527	0,00135	
0,25	1,33506	0,00132	

Die befriedigende Konstanz von a bestätigt die lineare Abhängigkeit, was noch durch die nebenstehende graphische Darstellung des Versuches veranschaulicht werden mag:

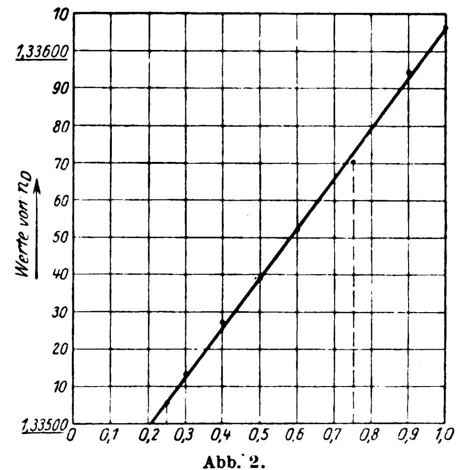


Abb. 2.

Wir sehen, daß die gefundenen n-Werte, trotz der Fehler, welche die Herstellung der Verdünnungen mit sich bringt, innerhalb der Fehlergrenze der Fermentversuche mit dem linearen Verlauf übereinstimmen, so daß man also die n_D-Zunahme proportional der Konzentrationszunahme setzen und als Maß der gelösten Substratmenge ansehen kann.

[1]) Literatur siehe bei *Robertson*, Die physikalische Chemie der Proteine (deutsch), S. 317 u. ff. Dresden 1912.

[2]) Wenn die Konzentration in Prozenten (Gramm Gelöstes in 100 ccm der Lösung) gegeben ist, so bedeutet a die n_D-Zunahme, welche das Auflösen eines Gramms des betreffenden Stoffes in 100 ccm des Lösungsmittels bewirkt.

IV. Inwieweit lassen sich Aussagen über die Fermentkonzentration machen?

Die n_D-Zunahme ist, da sie der gelösten Substratmenge proportional ist, ein Maß für den bei Gegenwart des Fermentes erfolgten Umsatz. Wenn man von diesem auf die Eigenschaften der Fermentlösung schließen will, ist zu bedenken, daß das Wesen der Fermentwirkung als die Beschleunigung eines, wenn auch unmerklich langsam, spontan verlaufenden Vorganges anzusehen ist. Die Wirkungsstärken von Fermentlösungen sind also nicht anders als an der Beschleunigung des untersuchten Vorganges zu messen bzw. zu vergleichen.

Dies kann in theoretisch einwandfreier Weise nur geschehen entweder, indem man in Fortschrittsversuchen[1]) den zu verschiedenen Zeiten erreichten Umsatz bestimmt, woraus sich auf Grund des Zeitgesetzes der Reaktion ihre Geschwindigkeitskonstante berechnen läßt oder, auch ohne Kenntnis des Reaktionsverlaufes, durch Vergleich der Zeiten gleichen Umsatzes, deren reziproke Werte den Geschwindigkeitskonstanten proportional sind; dies jedoch nur unter der Bedingung, daß sich das unbekannte Zeitgesetz durch den Zusatz des Fermentes in seiner Form nicht ändert[2]). Der weitere Schluß von den an dem Unterschied der Geschwindigkeitskonstanten gemessenen relativen Wirkungsstärken auf die relativen Fermentkonzentrationen erforderte die Kenntnis der Beziehung zwischen Fermentkonzentration und Wirkung, die gesondert zu ermitteln wäre, da es nicht auf die Konzentration des Trägers der Fermentwirkung, sondern auf die Konzentration des wirksamen Agens ankommt, wobei unter Umständen an Ferment-Substratbindungen im Sinne der Theorie von *Michaelis*[3]) zu denken ist und auch noch andere Komplikationen eintreten können; bei einem makroheterogenen System speziell kann, wie *Grützner*[4]) ausführt, die Zahl der auf die Substratoberfläche wirkenden Einheiten nur $\sqrt[3]{n^2}$ mal zunehmen, wenn ihre Konzentration in der Volumeinheit der Lösung auf das n-fache angewachsen ist.

Handelt es sich jedoch nicht um die Messung der Fermentwirkung in ihrem rationalen Maß, sondern lediglich um den Vergleich von relativen Fermentkonzentrationen, so kann man entweder in einem Reihenversuch diejenige Verdünnung der zu untersuchenden Fermentlösung ermitteln, welche unter denselben Versuchsbedingungen gleich wirksam wie eine Vergleichslösung ist oder man kann für spezielle Zwecke auch die im allgemeinen verpönten, nach gleichen Zeiten abgebrochenen Versuche zur Bestimmung der Konzentration eines Fermentes wie folgt benützen: Man stellt eine Anzahl Versuche unter sonst ganz gleichen Bedingungen, aber mit verschiedenen Fermentkonzentrationen bzw. Verdünnungen einer gegebenen Fermentlösung an und trägt die nach gleichen Zeiten bei den verschiedenen Fermentkonzentrationen eingetretenen Umsätze oder eine diesen proportionale Größe (in unserem Falle die n_D-Zunahmen) als Ordinaten, die zugehörigen Fermentkonzentrationen bzw. Verdünnungsgrade als Abszissen in ein Koordinatensystem ein. In der abgebildeten Kurve ist dies z. B. für die von mir benützte Trypsinlösung geschehen auf Grund von Versuchen mit Plac. I als Substrat bei einer Versuchstemperatur von + 36,5° C und einer Versuchszeit von 1 Stunde 15 Minuten.

---

[1]) Im Sinne der *Grützner*schen Namensgebung; siehe *P. v. Grützner*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **141**, 63. 1911.

[2]) Siehe *G. Bredig*, Ergebn. d. Physiol. I/**1**, 134. 1902.

[3]) Literatur bei *H. Euler*, Chemie der Enzyme (2. deutsche Aufl.) I. Teil. S. 111 ff.

[4]) *P. v. Grützner*, Wien. med. Wochenschr. **1910**, S. 2269.

Hat man einmal für bestimmte Versuchsbedingungen eine solche Kurve durch eine Versuchsreihe festgelegt, so kann man bei einem unter den gleichen Bedingungen angestellten einzelnen Versuch aus der beobachteten n_D-Zunahme mittels der Kurve auf die Fermentkonzentration bzw. auf den Verdünnungsgrad der Lösung rückschließen. Die Genauigkeit dieses Schlusses ergibt sich aus folgender Überlegung: Bei der n_D-Zunahme müssen wir mit einem Fehlerbereich von $\pm 0{,}00005$ rechnen (siehe S. 432); es sind darum die Ordinaten der (stark ausgezogenen) Kurve, welche die Mittelwerte verbindet, um je 5 Ordinateneinheiten einmal zu vermehren und zu vermindern. Dann erhält man jenen Kurvenstreifen, in dem sicher alle n_D-Zunahmen liegen, die man bei den verschiedenen Fermentkonzentrationen finden kann. Wollen wir nun zu einer in einem bestimmten Fall gefundenen n_D-Zunahme die zugehörige Fermentkonzentration ermitteln, so haben wir in dem entsprechenden Abstand eine Parallele zur Abszissenachse zu ziehen und von ihrer Ein- und Austrittsstelle in bzw. aus dem Kurvenstreifen Lote auf die Abszissenachse zu fällen; ihre Fußpunkte geben die Konzentrationswerte an, zwischen denen die fragliche Konzentration der untersuchten Fermentlösung liegt. Für die Stellen $\Delta n_D = 50$; 100 und 119 ist das gemacht und man sieht unmittelbar, daß das Fehlerbereich mit wachsenden n_D-Zunahmen oder Fermentkonzentrationen absolut breiter wird. Die Brauchbarkeit einer solchen Kurve in ihren verschiedenen Abschnitten wird man aber aus der relativen Genauigkeit beurteilen, mit der sie die Fermentkonzentrationen zu ermitteln ermöglicht.

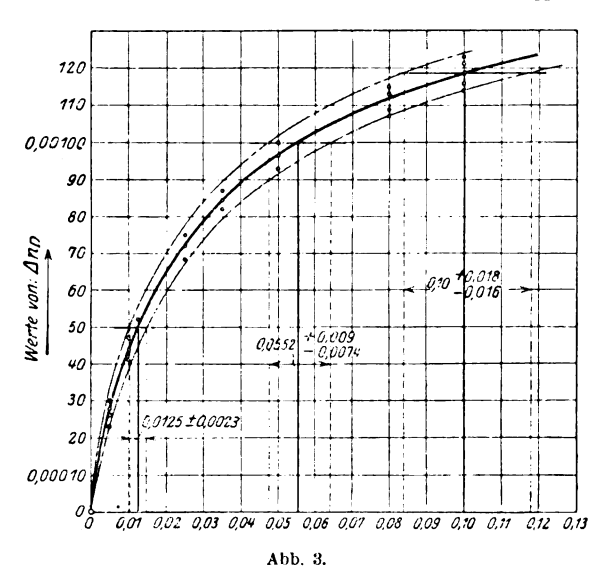


Abb. 3.

In der letzten Spalte der folgenden Tabelle sind die prozentuellen Fehler zusammengestellt, die sich aus den für die einzelnen Kurvenabschnitte graphisch bestimmten absoluten Fehlerbereiche ergeben.

Man sieht, daß die mittels der Kurve im Bereich von 0,01—0,1 unserer Konzentrationsskala bestimmten Fermentkonzentrationen mit einer Ungenauigkeit von ca. ± 13 bis $\pm 18\%$ behaftet sein werden. Bei geringeren Fermentkonzentrationen nimmt die relative Genauigkeit rasch ab.

Gesteigert kann die Genauigkeit des Verfahrens werden, wenn man einen Mittelwert aus mehreren Versuchen benützt und den mittleren Fehler des Mittelwertes rechnet; entsprechend diesem kann man dann den Kurvenstreifen verschmälern, während man bei einem einzelnen Versuch die Fehlergrenze von $\pm 0{,}00005$ in Betracht ziehen mußte.

Irgendeine theoretische Bedeutung kommt einer solchen Kurve, deren Form u. a. von der willkürlichen Wahl der Versuchsdauer abhängt, nicht zu; sie hat *lediglich* den Wert eines *graphischen Hilfsmittel*, an dem man aus den unter ganz

Tabelle XXXV.

n_D-Zunahme	wahrscheinlichster Abszissenwert	Fehlerbereich absolut	Fehlerbereich in Prozenten d. wahrscheinl. Abszissenwerte ca. %
0,00020	0,003	+0,0013 −0,0008	43 27
0,00030	0,0055	+0,0015 −0,0013	28 24
0,00040	0,0085	+0,002 −0,0015	23 18
0,00050	0,0125	+0,0023 −0,0023	18 18
0,00060	0,0175	+0,003 −0,0025	17 14
0,00070	0,0235	+0,0035 −0,0035	15 15
0,00080	0,031	+0,005 −0,004	16 13
0,00090	0,041	+0,0065 −0,0055	16 13
0,00100	0,0552	+0,009 −0,0074	16 13
0,00110	0,0755	+0,012 −0,0115	16 15
0,00119	0,10	+0,018 −0,016	18 16

bestimmten Versuchsbedingungen nach gleichen Zeiten ermittelten n_D-Zunahmen die Fermentkonzentration bzw. den Verdünnungsgrad ablesen kann. Gegenüber dem theoretisch einwandfreien Verfahren des Vergleiches von Verdünnungen gleicher Wirkung hat das zuletzt geschilderte insofern einen praktischen Vorteil, als man statt jedesmal eine ganze Versuchsreihe nur einen Versuch anzustellen braucht und daher mit weniger Untersuchungsmaterial auskommt.

Empfindlichkeit der Methode.

Allgemeine Angaben über die Empfindlichkeit der Methode, was den Fermentnachweis betrifft, lassen sich nicht machen, da sie wesentlich von der Wirkungsstärke des untersuchten Fermentes abhängen wird. Wenn die Empfindlichkeit der Methode gegenüber einem bestimmten Ferment beurteilt werden sollte, habe ich nachgesehen, welche geringste Konzentration des betreffenden Fermentes die Methode unter bestimmten Versuchsbedingungen nachzuweisen imstande ist. Dabei erwiesen sich die Versuche mit 24stündiger Dauer bei niedrigerer Versuchstemperatur gegenüber denen bei Bruttemperatur und kurzer Versuchszeit meist überlegen, während sich z. B. in Versuchen mit einer Versuchszeit von 1 Stunde 15 Minuten bei einer Temperatur von +37° C mit Plac. I als Substrat und Trypsinlösung in verschiedener Verdünnung folgende n_D-Zunahmen ergaben:

Trypsinlösung	n_D-Zunahme
0,0005 proz.	0 bis 0,00003
0,001 „	0,00006 „ 0,00012
0,005 „	0,00023 „ 0,00030

bekam ich bei Versuchen der ersten Art mit einer 0,0005 proz. Lösung des gleichen Trypsinpräparates viel größere Ausschläge, wie der folgende Versuch zeigen mag:

Versuch: Fermentlösung: 0,0005 proz. Trypsin (Merck) in physiologischer Kochsalzlösung mit einem Sodazusatz zu $^{1}/_{1000}$ Normalgehalt; 2 Stunden vor dem Versuchsbeginn bereitet.

Menge der Systemflüssigkeit: 0,5 ccm.

Substratmenge: 0,01 g.

Ausführung des Versuches nach Zeiteinteilung II.

Versuchstemperatur: +20° C.

Versuchszeit: $m - n = 24$ Stunden.

Tabelle XXXVI.

Substrat	n_{D_1}	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$
Plac. I . . .	1,33496	1,33516	+0,00020
Plac. II . . .	1,33492	1,33514	+0,00022
Plac. III . .	1,33492	1,33527	+0,00035
Pf.-Ser. . . .	1,33495	1,33533	+0,00038
R.-Ser. . . .	1,33493	1,33533	+0,00040

Aus den n_D-Zunahmen sieht man, daß unter diesen Versuchsbedingungen das Ferment in noch geringerer Konzentration, als es hier untersucht wurde, nachweisbar wäre.

Welche Substratmengen in Lösung gehen müssen, um deutliche Ausschläge zu geben, kann man — wenigstens der Größenordnung nach — erschließen aus der n_D-Zunahme, die eine bestimmte Flüssigkeitsmenge durch Auflösung einer gewogenen Menge eines entsprechenden Peptonpräparates erfährt. Mangels an Peptonpräparaten aus den als Substrat gebrauchten Trockenproteinen verwendete ich zu dieser Abschätzung Pepton e carne (Merck) und fand die Brechungsindices von 0,1 proz. Lösungen dieses Peptonpräparates in physiologischer Kochsalzlösung und in Gemischen von Kochsalzlösung mit Serum um 0,00017—0,00019 höher als die des Lösungsmittels. Da der refraktometrische Index der Lösungsprodukte der Substrate nicht wesentlich von dem des verwendeten Peptons verschieden sein dürfte, so kann man sagen, daß bei einer Menge der Systemflüssigkeit von 0,5 ccm die fermentative Auflösung von 0,0005 g des Substrates einen deutlichen Ausschlag von obiger Größenordnung geben wird.

Zusammenfassung.

Pregl und *de Crinis* [1]) haben zum Nachweis von spezifischen Serumfermenten, der sog. Immuno- oder Abwehrfermente, in kleinsten Serummengen eine Methode angegeben, bei der ein aus dem festen Substrat und der auf fermentative Eigenschaften zu untersuchenden Flüssigkeit bestehendes Reaktionssystem benützt, die Änderung des Brechungsindex des flüssigen Systemanteiles mittels des *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometers beobachtet und als Zeichen der stattgehabten Fermentwirkung genommen wird. Diese Mikromethode gebrauche ich seit längerer Zeit zur Untersuchung auch anderer proteolytischer Fermente. Dabei wurden ihre Fehlerquellen eingehend untersucht und das Verfahren in quantitativer Hinsicht ausgestaltet. Wegen seiner Anwendung für

[1]) a. a. O.

den Nachweis von Abwehrfermenten wurden auch die methodischen Besonderheiten berücksichtigt, die beim Arbeiten mit Serum sich ergeben.

Aus der Untersuchung der Fehlerquellen erhellt, daß man unter den hier eingehaltenen Versuchsbedingungen Brechungsindexzunahmen von 0,00010 angefangen, als Zeichen einer Fermentwirkung nehmen kann und daß die Ausschläge der für quantitative Zwecke ausgearbeiteten Methode unter gleichen Umständen innerhalb eines Fehlerbereiches von $\pm$ 0,00005 übereinstimmen. Ferner ließ sich zeigen, daß die Methode bei Ausschlägen bis 0,00150 ausschließlich und rein die *fermentative Auflösung des Substrates* erfaßt, während sich der Abbau selbst der Beobachtung entzieht und daß die beobachteten n_D-Zunahmen proportional der gelösten Substratmenge sind: Sie geben also ein Maß für die Auflösung des Substrates, was das Verfahren zum quantitativen Studium der fermentativen Lösung koagulierter Proteine geeignet erscheinen läßt. Endlich wurde dargetan, inwieweit die Methode Rückschlüsse auf die Fermentkonzentration erlaubt, und schließlich ihre Empfindlichkeit aufgezeigt.

Eine Mikromethode zur Bestimmung von Äthylalkohol im Blut.

Von

Erik M. P. Widmark.

(Medizinisch-chemisches Institut, Lund.)

(Eingegangen am 29. April 1922.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Eine Anzahl Probleme der Alkoholforschung stehen vor ihrer Lösung, sobald wir über eine hinreichend bequeme und genaue Methode zur Bestimmung der Alkoholkonzentration im Blute unter verschiedenen Versuchsbedingungen verfügen.

Die diesem Zwecke dienenden älteren Methoden, die allzu gut bekannt sind, um hier besprochen zu werden, haben alle den gemeinsamen Nachteil, daß sie zu große Blutmengen erfordern (mindestens 1—2 ccm), um beim Menschen oder kleineren Tieren in größerer Ausdehnung verwendet werden zu können.

Das Verfahren, durch Bestimmungen des Alkoholgehaltes im Urin indirekt die Veränderungen desselben im Blute zu ermitteln, hat sicherlich einen gewissen Vorteil[1]. Aber nicht unter allen Versuchsbedingungen tritt ein Diffusionsgleichgewicht zwischen Alkohol des Blutes und des Urins ein und besonders rasche Schwankungen der Blutalkoholkonzentration widerspiegeln sich nicht immer getreu in der des Urins.

Ich habe deshalb seit mehreren Jahren nach einer Mikromethode zur Bestimmung des Äthylalkoholgehaltes des Blutes gesucht und an eine solche die Forderung gestellt, daß sie für eine Bestimmung nicht mehr Blut erfordern soll, als man leicht aus der Stichwunde eines Fingers erhalten kann, d. h. ungefähr 100 mg.

Es zeigte sich bald, daß das zweckmäßigste Prinzip für eine solche Mikromethode die früher meist verwendete Bichromatmethode war.

Lange bereitete mir die Destillation des Blutes Schwierigkeiten. Die notwendig große Verdünnung des Blutes bei der gewöhnlichen Destillation bedingte ein großes Destillat, welches auch in einer verhältnismäßig großen Menge Schwefelsäure aufgefangen werden mußte,

[1]) *Widmark*, Skandinav. Arch. f. Physiol. **33**, 85—96. 1915.

damit die Reduktion des Bichromats mit hinreichender Geschwindigkeit vor sich gehen konnte. Die große Säuremenge ihrerseits bedingte die Notwendigkeit einer starken Verdünnung mit Wasser oder Neutralisierung mit einer großen Menge Lauge, wenn eine Titration des Bichromatüberschusses mit Jodkalium und Thiosulfat ausgeführt werden können soll. Auf diese Weise wurde das Verhältnis zwischen angewandten Chemikalien einerseits und der geringen Alkoholmenge andererseits unproportional. Die Bestimmungen wurden in hohem Grade unsicher.

Ich habe deshalb bei der Methode, die auf folgenden Seiten beschrieben wird, ein ganz neues Destillationsprinzip eingeführt, welches auf der Begierde beruht, mit der Schwefelsäure sowohl Wasser als auch Alkohol aufnimmt. Es ist eine bekannte Erscheinung, daß, wenn man eine Schale mit verdünntem Alkohol in einen Exsiccator über Schwefelsäure stellt, das spezifische Gewicht der Alkohollösung von Tag zu Tag kräftig zunimmt. Der Alkohol wird also sogar rascher als Wasser aufgenommen. Dieses Prinzip hat sich als sehr gut anwendbar erwiesen, um aus Tropfen alkoholhaltigen Blutes den Alkohol quantitativ in eine Bichromat-Schwefelsäuremischung zweckmäßiger Zusammensetzung überzuführen.

Das Verfahren hat vor der gewöhnlichen Destillation verschiedene Vorteile, von denen die wichtigsten hier erwähnt seien:

a) Der Vorgang verläuft in einem vollständig geschlossenen Raum, wodurch Verdunstungsverluste nach außen verhindert werden.

b) Das Schäumen des Blutes entfällt vollständig.

c) Die Destillation verläuft bei verhältnismäßig niederer Temperatur (50—60°), wodurch eventuelle Zersetzung des Blutes vermieden wird. Sie ist außerdem so vollständig, daß das Blut zur Trockne verdunstet.

d) Praktisch genommen, können eine beliebige Anzahl Destillationen gleichzeitig ausgeführt werden.

e) Die verwendeten Chemikalienmengen können stark vermindert werden. Das Blut braucht überhaupt nicht verdünnt zu werden. Es genügt eine Bichromat-Schwefelsäuremenge von höchstens 1 ccm (gegenüber 5 früher). Bei der Titration braucht diese Mischung nur mit 25 ccm Wasser (gegenüber mehr als 100 ccm früher) verdünnt zu werden[1]).

Im folgenden werden zuerst die zur Ausführung der Bestimmung erforderlichen Apparate und Lösungen beschrieben, worauf eine eingehendere Beschreibung der Methode, Genauigkeit, Fehlerquellen und wichtiger Einzelheiten folgt.

---

[1]) In der Tat sind schon 0,1 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinreichend, um 100 mg Blut genügend zu trocknen. Die Methode dürfte daher Möglichkeiten aufweisen, sie auch zur Bestimmung einer großen Anzahl anderer flüchtiger Stoffe im Blute anzupassen.

Apparate.

1. *Destillationskolben.* Ein 50 ccm Erlenmeyerkolben aus Jenaerglas (Abb. 1) mit gut eingeschliffenem Glasstopfen. Der Stopfen (Abb. 2) ist nach oben ausgezogen und zu einem Haken gekrümmt, so daß man ihn bequem auf einem zweckmäßigen Stativ aufhängen kann; nach unten trägt er an einem vertikalen Stiel einen kleinen Behälter, der ca. 200 cmm faßt. Der Stiel soll so lang sein, daß sich der Behälter $^1/_2$ bis 1 cm über den Boden des Kolbens befindet. Für Serienbestimmungen benötigt man ein paar Dutzend solcher Kolben, die sowohl am Kolben als auch am Stopfen nummeriert sein sollen.

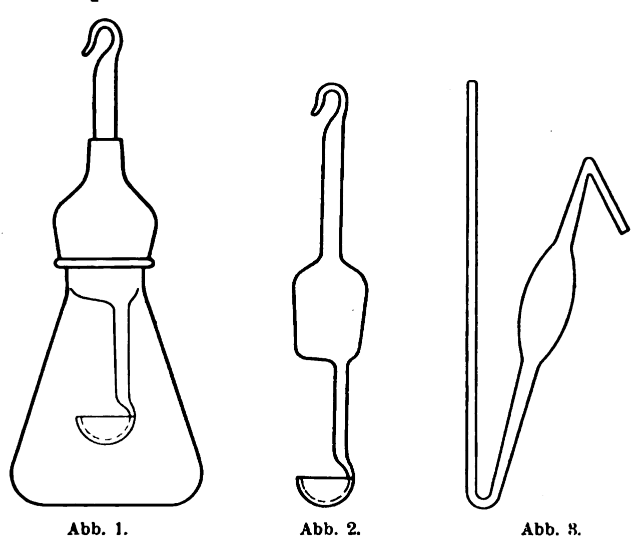


Abb. 1. Abb. 2. Abb. 3.

Der Apparat wird von *R. Grave*, Stockholm, ausgeführt.

Während des Erwärmens des Apparates im Wasserbad verwendet man zum Festhalten der Glaspfropfen Gummikappen (Saugkappen), die nach dem Abschneiden der Spitze über den Kolbenhals gezogen werden.

2. Holzstativ mit Haken zum Aufhängen der Glasstopfen in Reihen. Die Höhe der Haken über der Tischfläche soll ungefähr 14 cm betragen.

3. Capillarrohre zum Aufsaugen und Wägen des Blutes (nach *Ljungdahl*). Die Form ergibt sich aus Abb. 3. Sie dürfen leer nicht über 300 mg wiegen und sollen 100—150 cmm fassen[1]).

4. Torsionswage nach *Hartmann* und *Braun* gleicher Konstruktion, wie sie zu *Bangs* Mikromethode verwendet wird.

5. Dünner Gummischlauch von der Stärke der Fahrradventilgummischläuche, ca. 3 dm lang.

[1]) Die Capillarrohre sind bei *G. Werner*, Med.-chem. Institut, Lund, erhältlich.

6. Büretten. Zur Bestimmung größerer Alkoholmengen („größere Modifikation“) eine Bürette 5—10 ccm fassend, ein Teilstrich 0,05 ccm entsprechend. Für geringere Alkoholmengen („kleinere Modifikation“) eine Mikrobürette 2 ccm fassend, in 0,02 ccm geteilt.

7. Pipetten. Eine 1 ccm-Pipette, sowie eine Pipette zur ungefähren Messung von 0,5 ccm. Sie brauchen nicht ausgewogen zu sein.

8. 25 ccm Mensur.

9. Ein kleiner Trichter.

10. Wasserbad mit Thermometer. Das Bad soll ein paar Dutzend Kolben fassen. Anordnung zu ihrer Befestigung.

11. Apparat zur Reinigung der Destillationskolben mit Wasserdampf. Siehe *Ostwald-Luther*, Physikalisch-chemische Messungen. 3. Aufl. S. 469. Zum Trocknen der Kolben eine Wasserstrahlpumpe mit vertikal befestigtem Glasrohre, auf dem sie aufrecht und verkehrt aufgehängt werden können.

Lösungen.

1. Bichromat-Schwefelsäure. Zur Bestimmung größerer Alkoholmengen bis zu $5^0/_{00}$ werden 0,250 g reines umkrystallisiertes Kaliumbichromat in 1 ccm destilliertem Wasser gelöst und quantitativ in einen 100 ccm-Meßkolben überführt, worauf mit reiner konzentrierter Schwefelsäure bis zur Marke aufgefüllt wird. Für Bestimmungen von unter $1^0/_{00}$ Alkoholgehalt löst man auf gleiche Weise 0,050 g Bichromat zu 100 ccm.

2. 5 proz. jodatfreie Jodkaliumlösung.

3. $^n/_{100}$ oder $^n/_{200}$ -Thiosulfatlösung.

4. 1 proz. Stärkelösung.

Sämtliche Lösungen werden im Dunkeln aufbewahrt.

Ausführung der Bestimmung.

a) Reinigung der Kolben.

Die Destillationsapparate müssen vollkommen rein und frei von reduzierenden Verunreinigungen (Fett) sein. Auch müssen sie vollkommen trocken sein. Am leichtesten reinigt und trocknet man sie auf folgende Weise. Man spült sie nacheinander mit Bichromat-Schwefelsäuremischung (dies jedoch nur, wenn sie das erstemal in Gebrauch genommen werden), Wasserleitungswasser und destilliertes Wasser. Dann werden sie 1—2 Minuten lang mit Dampf ausgeblasen, worauf man sie unmittelbar an die Wasserstrahlpumpe bringt. Bei kräftig wirkender Pumpe trocknen die Kolben innerhalb einiger Minuten und sind nun gebrauchsfertig.

Die Glaspfropfen legt man in öfters zu erneuerndes destilliertes Wasser, worauf sie an der Luft an staubfreier Stelle trocknen gelassen werden.

Die Capillaren sind durch das Erhitzen bei deren Erzeugung von jeder Spur flüchtiger Stoffe befreit und bedürfen keiner weiteren Reinigung. Jede Capillare wird nur einmal verwendet.

b) Abmessen der Bichromat-Schwefelsäuremischung.

Die Präzision der Methode beruht zum großen Teil auf der Genauigkeit, mit der die Bichromat-Schwefelsäuremischung abgemessen wird. Da man für jede Serie mittels Blindprobe den Titer dieser Mischung bestimmt und da man zu jeder Abmessung in der Bestimmungsserie die gleiche 1 ccm-Pipette und die gleiche Lösung verwendet, so ist leicht einzusehen, daß die Größe der absoluten Menge der Lösung von untergeordneter Bedeutung ist. Wichtig ist, daß jeder Kolben so weit als möglich die gleiche Menge Bichromat erhält. Bei meinen Versuchen bin ich auf folgende Weise vorgegangen. Man saugt die Pipette bis zur Marke mit der Lösung voll und führt dieselbe hierauf vorsichtig in den Kolben ein, bis die Spitze den Boden berührt. Nun läßt man die Flüssigkeit während einer Zeit von 60 Sekunden (Kontrolluhr) ausfließen. Es ist von Wichtigkeit, daß die Schliffstelle des Kolbenhalses nicht durch Flüssigkeit verunreinigt wird.

Unmittelbar nach der Beschickung jedes Kolbens wird der dazu gehörige Glaspfropfen eingefügt, um die Schwefelsäure vor Luftfeuchtigkeit und Verunreinigungen zu schützen. Auf diese Weise kann man die ganze Anzahl Kolben vorbereiten, die zu einer Seriebestimmung erforderlich sind. Nach der Beschickung sollen die Kolben im Dunkeln aufbewahrt werden.

c) Abmessung der Blutquantität.

Die zu benötigende Blutmenge wird leicht durch einen gewöhnlichen Fingerstich erhalten. Natürlich darf man die Haut weder mit Alkohol noch mit Äther reinigen, sondern, wenn dies erforderlich, mit Seife und Wasser oder Sublimatlösung. Man senkt den kurzen Schenkel der Capillare in den Blutstropfen, wobei sich dieselbe automatisch füllt. Will man die Füllung beschleunigen, so kann man mittels eines am freien Ende der Capillare angebrachten dünnen Gummischlauches schwach saugen. Nachdem sich die Capillare soweit gefüllt hat, daß sich der Meniscus ungefähr $^1/_2$ cm vom freien Ende derselben befindet, wird der kurze Schenkel vorsichtig von Blut getrocknet. Hierauf wird auf der Torsionswage gewogen. Danach wird das Blut unter Zuhilfenahme des dünnen Gummischlauches in den Behälter des im Vorwege aufgehängten Glaspfropfens durch die gleiche Capillare, durch die es einströmte (durch den kurzen Schenkel), ausgeblasen. Der Glaspfropfen wird unmittelbar in seinen Kolben eingefügt. Die entleerte Capillare wird neuerdings gewogen und ergibt die Differenz bei der Wägung das Gewicht der Blutprobe.

d) Die Destillation.

Nachdem die Kolben auf diese Weise mit Blut beschickt wurden, vermehrt man die Serie um drei Blindproben, d. h. Kolben, welche nur die Bichromat-Schwefelsäuremischung enthalten. Zum Dichten des Glasschliffes habe ich einen Tropfen Wasser auf den oberen Schliffrand gegeben, der dann durch die Capillaratraktion zwischen die Schliffflächen eingezogen wird. Vielleicht könnte man sich auch irgendeines Hahnschmiermittels bedienen. Hierbei muß man jedoch die größte Vorsichtigkeit walten lassen, damit die Schmiere weder mit der Bichromat-Schwefelsäuremischung in Berührung, noch bei der nachfolgenden Reinigungsprozedur in den Kolben kommt. Schließlich werden die Gummikappen aufgesetzt. Durch Befeuchten der Innenseiten derselben mit einigen Tropfen Wasser wird die Prozedur wesentlich erleichtert. Nun taucht man die Kolben in ein Wasserbad von 50—60°. Die Kolben sollen sich vollständig im Wasser befinden und hier während ca. 2 Stunden (± 15 Minuten) verbleiben.

e) Die Titration.

Die Kolben werden vorsichtig herausgenommen, getrocknet und von Gummikappen und Glaspfropfen befreit. Letzteres muß mit großer Vorsichtigkeit geschehen, da das nun gänzlich pulvertrockene Blut sich leicht vom Behälter loslöst und durch eine unvorsichtige Bewegung in die Schwefelsäure fallen kann, was die Probe sicher unbrauchbar machen würde.

Man setzt nun mittels eines kleinen Trichters 25 ccm destilliertes Wasser zu. Sind alle Kolben auf diese Weise gefüllt, so wird sorgfältig umgeschüttelt und je $^1/_2$ ccm Jodkaliumlösung zugesetzt. $^1/_2$—1 Minute nach dem Jodkaliumzusatz wird mit Thiosulfatlösung titriert. Wird die Bestimmung mit der größeren Menge Bichromat durchgeführt, so verwendet man hierzu die größere Bürette und eine $^1/_{100}$ n-Lösung. Bei Verwendung der geringeren Menge bedient man sich der kleineren Bürette und einer $^1/_{200}$ n-Thiosulfatlösung. Die Stärkelösung (1proz.) wird erst gegen Schluß der Titration zugesetzt. Der Farbenumschlag tritt mit ca. $^1/_2$ Tropfen $^n/_{100}$ Thiosulfatlösung ein. Eine Nachbläuung tritt immer auf. Man nimmt darauf keine Rücksicht, achtet aber darauf, daß man nicht zu langsam titriert und daß die Titration spätestens eine Minute nach dem Jodkaliumzusatz beginnen soll.

f) Die Berechnung.

Der Unterschied zwischen dem Thiosulfatverbrauch des Blindprobenmittels und der Blutprobe ist der Alkoholmenge in der Probe proportional. (Das Mittel wird von der zweiten und dritten Blindprobe genommen. Nr. 1 wird als Vorprobe verwendet und pflegt in Übereinstimmung mit einer alten Erfahrung in der Mikrotechnik fast immer zu

nieder auszufallen). 0,01 ccm $^{n}/_{100}$ Thiosulfatlösung entsprechen 1,13 γ[1]) Athylalkohol. Zur Berechnung kann zweckmäßig folgende Formel verwendet werden:

$$X = 1{,}13\ (b - a),$$

worin X die gesuchte Alkoholmenge in γ, b den Verbrauch der Blindprobe und a den der Blutprobe an $n/_{100}$ Thiosulfatlösung in $^{1}/_{100}$ ccm bedeutet.

Wird eine $^{n}/_{200}$ normale Thiosulfatlösung verwendet, so wird der Vergleichsfaktor halb so groß, d. h. 0,57.

Prüfung der Einzelheiten.

a) Bestimmung der Konstanten 1.13.

Das Verhältnis zwischen Alkoholmenge und reduziertem Bichromat kann theoretisch nicht berechnet werden, da der Äthylalkohol nicht quantitativ in eines seiner Oxydationsprodukte überführt wird. Es scheint sich eher ein Gleichgewichtszustand zwischen Aldehyd, Essigsäure und eventuell Kohlensäure zu bilden. Dieser Gleichgewichtszustand kann auch als im Verhältnis zur Schwefelsäurekonzentration etwas variierend angenommen werden.

Zur Ermittlung des erwähnten Verhältnisses wurde eine Serie Bestimmungen mit bekannten Alkoholmengen ausgeführt.

In einem Meßkolben wurden 700—800 g destilliertes Wasser mit einer Genauigkeit von 1 mg abgewogen. Hierauf wurde eine geringe Menge absoluten Alkoholes zugesetzt, worauf eine neuerliche Wägung die Berechnung des Alkoholgehaltes der Lösung per Gewichtseinheit ermöglichte.

Da die Blutproben durch Wägen ihrem Gewichte und nicht ihrem Volumen nach bestimmt werden, habe ich oben erwähntes Verfahren als das rationellste erachtet, um sowohl reine Alkohollösungen als auch alkoholhaltiges Blut zu bereiten und zu berechnen. *In Nachstehendem werde ich mich auch folgender Ausdrucksweise bedienen: unter einer Alkohollösung von 1 promilliger Konzentration wird eine Lösung verstanden, welche in 1 g 1 mg Alkohol enthält.*

In allem wurden 54 Bestimmungen mit reinen Alkohollösungen ausgeführt, die zwischen 5,06 und 1,43$^{0}/_{00}$ variierten. Die Bestimmungen wurden teils von med. cand. *C. A. Jeppsson* und teils vom Verfasser ausgeführt. Das Resultat ergibt sich aus Tabelle I. Wird die berechnete Alkoholmenge ausgedrückt in γ mit dem Wert für die reduzierte Bichromatmenge ausgedrückt in $^{1}/_{100}$ ccm dividiert, so erhält man den Quotienten, den man in der vorletzten Kolonne der Tabelle wiederfindet.

---

[1]) $\gamma = 0{,}001$ mg.

Tab. I. Das Verhältnis zwischen Alkoholmenge u. reduziertem Bichromat.

Gewicht der Probe mg	Berechnete Alkoholmenge γ	Reduziertes Bichromat, $^{n}/_{100}$ ccm · 100	$k = \frac{\text{Alkohol}}{\text{Bichromat}}$	Konzentration der Alkohollösung ‰
79	400	356	1,124	5,06
68	344	309	1,113	
49	248	223	1,112	
41	208	180	1,156	
111	480	422	1,137	4,32
102	441	382	1,154	
70	303	267	1,135	
62	268	238	1,126	
34	134	122	1,098	3,94
151	453	295	1,147	3,00
143	429	380	1,129	
125	375	330	1,136	
123	369	340	1,087	
109	326	290	1,124	
108	323	285	1,133	
107	320	300	1,067	
94	282	242	1,165	
93	279	253	1,103	
92	276	247	1,117	
91	273	240	1,138	
81	243	215	1,130	
79	237	207	1,145	
78	234	216	1,083	
73	219	195	1,126	
72	216	187	1,155	
70	210	190	1,105	
69	207	180	1,150	
68	204	170	1,200	
67	201	181	1,110	
63	189	165	1,145	
60	180	145	1,241	
59	177	160	1,106	
57	171	142	1,204	
56	168	140	1,200	
56	168	149	1,128	
56	168	150	1,120	
50	150	150	1,000	
47	141	122	1,156	
44	132	112	1,179	
42	126	110	1,145	
40	120	100	1,200	
82	226	207	1,092	2,75
81	223	196	1,138	
76	209	183	1,142	
71	194	182	1,066	
56	153	140	1,093	
53	146	130	1,123	
75	107	97	1,103	1,43
73	104	95	1,095	
71	101	88	1,148	
65	93	84	1,107	
64	91	80	1,138	
49	70	61	1,148	
47	67	64	1,047	

Als Mittel wird 1,129 erhalten, mit einem Mittelfehler von $\pm 0{,}041$ für die einzelne Bestimmung und einem Mittelfehler des Mittels von $\pm 0{,}006$. Der größte Wert war 1,241, der kleinste 1,000.

Bei der Benützung einer $^{n}/_{100}$ Thiosulfatlösung ist also die Konstante 1,13 zu verwenden, d. h. 0,01 ccm $^{n}/_{100}$ Thiosulfatlösung entsprechen 1,13 γ Alkohol.

Eine Serie Bestimmungen unter Anwendung der kleineren Bichromatmenge, die Bestimmungen bis zu 100 γ Alkohol zuläßt, wurde vom Dozenten *J. Olow* ausgeführt. Hierbei wurde bei der Titration mit einer $^{1}/_{200}$ n-Thiosulfatlösung als Mittelwert von k (18 Bestimmungen) 0,575 mit einem Mittelfehler für die einzelne Bestimmung von $\pm 0{,}030$ und einem Mittelfehler des Mittels von $\pm 0{,}007$ erhalten. Der größte Wert war 0,632, der kleinste 0,521. Da hier eine halb so starke Thiosulfatlösung als in der vorhergehenden Serie zur Anwendung gelangte, so sollte man hier auch einen halb so großen Wert oder 0,565 erhalten. Die Abweichungen liegen auch innerhalb der Fehlergrenze.

Das Verhältnis zwischen Alkoholmenge und reduziertem Bichromat muß also für das ganze untersuchte Gebiet als konstant angesehen werden. Auch konnte kein Einfluß des Gewichtes der Alkohollösung bemerkt werden, irgendeine Beziehung zwischen der Größe der Konstanten und dem Gewichte der Probe gibt es nicht.

b) Genauigkeit der Destillation.

Diese wurde auf die Weise geprüft, daß die oben erwähnte Konstante in Versuchen bestimmt wurde, bei denen der Alkohol direkt zur Bichromat-Schwefelsäuremischung zugesetzt wurde. Hierbei wurden größere Alkoholmengen, zwischen 2,53 und 10,06 mg variierend, verwendet. Die Bichromat-Schwefelsäuremischung bestand aus 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 2 ccm $^{n}/_{2}$ Kaliumbichromatlösung. Die Titration wurde nach dem Verdünnen der Lösung mit 400 ccm Wasser mit einer $^{n}/_{10}$ Thiosulfatlösung ausgeführt. Als Wert für die Konstante wurde $1{,}136 \pm 0{,}009$ erhalten, also ein mit dem der Mikromethode gut übereinstimmender Wert ($1{,}129 \pm 0{,}006$).

Die Destillationsart der Mikromethode dürfte daher als vollkommen verläßlich bezeichnet werden können und ist für die quantitative Gewinnung des Alkohols zumindest gleichgut, aber bedeutend bequemer als die gewöhnliche Destillation.

c) Fehler der Methode bei der Bestimmung von Äthylalkohol in Blut.

Normal enthält das Blut geringe Mengen Alkohol, welche von verschiedenen Verfassern auf ungefähr 0,03 Promille geschätzt werden. Um die Fehler der Methode durch Bestimmungen von Blut, dem eine bekannte Menge Alkohol zugesetzt wurde, kontrollieren zu können, habe

ich in die Bestimmungsserien Blindproben eingereiht, welche mit Blut beschickt waren, dem kein Alkohol zugesetzt worden ist. Der von diesen Proben erhaltene Wert wurde in den Kontrollserien als Nullwert verwendet. Gleichzeitig mit diesen Blindproben wurden in die Serien nicht beschickte Blindproben eingereiht. Der Unterschied zwischen diesen zwei Arten von Blindproben zeigt uns den physiologischen Gehalt des Blutes an flüchtigen reduzierenden Stoffen an. Das Resultat dieser Messungen ergab, daß diese Stoffe gewöhnlich in so geringer Menge vorhanden sind, daß der Wert derselben zum größten Teil innerhalb der Fehlergrenzen der Methode fällt. Eine Ausnahme hiervon macht das Aceton. In einem Falle von Acetonämie ist die Methode also unbrauchbar.

Tabelle II.

Versuchsserie ausgeführt von med. cand. *C. A. Jeppsson.*
Berechneter Alkoholgehalt im Blute: 3,20‰.

Gewicht der Probe mg	Berechnete Alkoholmenge γ	Beobachtete Alkoholmenge γ	Differenz γ	Beobachtete Konzentration ‰
44	141	131	−10	2,98
44	141	140	−1	3,18
55	176	171	−5	3,14
56	179	185	+6	3,30
59	189	186	−3	3,15
67	214	221	+7	3,30
72	230	228	−2	3,17
80	256	235	−21	2,94
83	266	281	+15	3,39
94	301	288	−13	3,06
98	314	315	+1	3,21
99	317	311	−6	3,14

Tabelle III.

Versuchsserie ausgeführt von med. cand. *C. A. Jeppsson.*
Berechneter Alkoholgehalt im Blute: 4,56‰.

Gewicht der Probe mg	Berechnete Alkoholmenge γ	Beobachtete Alkoholmenge γ	Differenz γ	Beobachtete Konzentration ‰
54	246	247	+1	4,57
57	260	255	−5	4,47
60	274	268	−6	4,47
63	287	297	+10	4,71
67	306	298	−8	4,45
74	337	312	−25	4,22
76	347	358	+11	4,71

Außer diesen beiden Serien werden in untenstehender Tabelle IV noch drei weitere, vom Verfasser ausgeführte Serien, zusammenfassend wiedergegeben.

Tabelle IV.

Zusammenstellung der Bestimmungsresultate von Tabelle II und dreier weiterer vom Verfasser ausgeführten Serien.

Anzahl Bestimmungen	Berechnete Alkoholkonzentration ‰	Abweichungsmitt. v. d. berechneten Alkoholmenge γ	Mittelfehler f. die einzelne Bestimmung γ	Maximale Abweichung von der berechneten Alkoholmenge γ	
12	3,20	−2,7	+10	−21	+15
7	4,56	−3,0	+12	−25	+11
4	2,25	−2,5	+ 2,8	−3	
7	1,89	−3,0	+ 3,5	−12	+6
6	1,04	−1,0	± 5,9	−13	+5

Wie aus der zweiten Kolummne der Tabelle ersichtlich ist, geben die Bestimmungen etwas zu niedere Resultate, indem das Mittel für die Abweichungen von der berechneten Alkoholmenge in der Regel ein Minus von 1—3 aufweist. Dieser konstante Fehler ist indessen so unbedeutend, daß die Brauchbarkeit der Methode hierdurch in keiner Weise geschmälert wird.

In den ersten beiden Serien ist der Mittelfehler größer als in den letzteren, was vielleicht auf eine Verschiedenheit in der Übung oder vielleicht darauf, daß die beiden ersten Serien mit größeren Alkoholmengen als die letzteren ausgeführt wurden, zurückzuführen ist. Der Fehler ist jedoch von einer solchen Größenordnung, daß *das Analysenresultat mit nicht mehr als zwei verläßlichen Ziffern ausgedrückt werden darf.*

d) Praktische Verwendbarkeit der Methode.

In einer Mitteilung, die später zur Veröffentlichung gelangen wird, wird gezeigt werden, wie die Methode praktisch verwendet werden kann, um den Veränderungen der Alkoholkonzentration im Blute bei Menschen und Tieren folgen zu können.

Wie sich aus dem Vorhergehenden ergibt, habe ich die Methode in zwei Modifikationen geteilt, von denen die „größere" verwendet werden soll, wenn es gilt, größere Alkoholkonzentrationen zu studieren, die sich beim Menschen erst nach deutlichen Anzeichen von Berauschung finden. Diese Modifikation kann also in Aufnahmeanstalten zur Untersuchung berauschter Personen oder zur Stellung der Differentialdiagnose, sowie bei Tierversuchen Verwendung finden. Die „kleinere" Modifikation kann zu Laboratoriumsversuchen mit Versuchspersonen, welche verhältnismäßig unbedeutende Mengen von Äthylalkohol zu sich genommen haben, verwendet werden. Schon nach einem Genusse von 5 g Alkohol dürfte dieser mit Sicherheit im Blute nachgewiesen werden können und nach einer Einnahme von 20 g kann die Alkoholkurve verfolgt werden.

Dadurch, daß ich mehrere verschiedene Personen habe Bestimmungen mit der Methode ausführen lassen, habe ich mich davon überzeugt, daß dieselbe leicht erlernt wird und bald sichere Resultate ergibt.

Für denjenigen, der sich der Methode bedienen will, dürfte es jedoch von größter Wichtigkeit sein, daß er sich dieselbe durch Bestimmungen von reinen bekannten Alkohollösungen aneignet, so daß er sich nach dem Ausführen einiger Serien davon überzeugen kann, ob sich der Vergleichsfaktor auf den von mir angegebenen Wert einstellt.

Zum Schlusse will ich einiges über den schwächsten Punkt der Methode erwähnen. Dieser besteht darin, daß man kaum eine Bichromat-Schwefelsäurelösung herstellen kann, die einen exakten und ein für allemal bestimmten Titer aufweist. So erhält man bei der Darstellung eine Lösung, die schwächer als die berechnete ist und eine solche Lösung vermindert nach und nach ihren Titer dadurch, daß die Schwefelsäure das Bichromat reduziert. Besonders rasch tritt dies ein, wenn die Lösung dem Lichte ausgesetzt ist. Eine solche Verminderung der Bichromatmenge findet auch während der Zeit statt, da die Probe im Wasserbad steht. Den hierdurch entstehenden Fehler kann man nur durch das Einführen von Blindproben, welche auf die genau gleiche Weise wie die Blutproben behandelt werden, vermeiden. Dies kann derart durchgeführt werden, daß man bei Serienversuchen sämtliche beschickten Kolben in einem dunklen Kasten ansammelt, wo sie stehengelassen werden, bis man sie alle auf einmal zusammen mit den Blindproben ins Wasserbad einsetzt und dann wieder auf einmal aus demselben herausnimmt.

Beiträge zur bakteriellen Gärung.

Von

Fritz Müller.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Krankenhauses am Urban.)

(Eingegangen am 29. April 1922.)

Diese Arbeit verdankt ihre Entstehung einer Anregung von Prof. *L. F. Meyer*, der den Wunsch äußerte, die Ergebnisse von *Ernst Wolff*[1]) über den Einfluß verschiedener Nährlösungen auf die Gärung durch Bact. lactis aerogenes mit physikalisch-chemischer Methodik zu ergänzen.

Wolff hatte sein Augenmerk hauptsächlich auf die Beeinflussung der Gärung durch verschiedene Zuckerkonzentrationen und bei variierter Menge von Eiweißzusatz gerichtet. Die Stärke der Gärung wurde durch die Menge der Säurebildung beurteilt, letztere durch die Titration mittels 0,1 NaOH gegen Phenolphthalein gemessen. Auf die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen und die Schlußfolgerungen, die daraus gezogen wurden, soll im Verlauf der Arbeit zurückgekommen werden.

Der bakt. Gärung, der für den physiologischen Verdauungsvorgang des Säuglings, insbesondere für die Pathogenese der Ernährungsstörungen eine so weittragende Bedeutung zugemessen wird, ist in ihren physikalisch-chemischen Bedingungen in Deutschland jedenfalls wenig studiert worden. Darum ist es begrüßenswert, daß gerade in letzter Zeit in ausgezeichneten Arbeiten von *Scheer*, *Adam*[2]), *Freudenberg* und *Heller*[3]) diese Verhältnisse besonders berücksichtigt sind, und, wie es scheint, mit nicht geringem Erfolg. Vorliegende Untersuchungen werden teilweise unvermeidlich in das systematisch bearbeitete Gebiet der Heidelberger Schule übergreifen, andererseits dürften sich vielleicht doch gewisse Ergänzungen aus ihnen ergeben. Die erste exakte physikalisch-chemische Beobachtung über den Verlauf der bakteriellen Gärung rührt von *Michaelis* und *Marcora*[4]) her aus dem Jahre 1914. Hiernach stellt ein bestimmtes Bact. coli, auf eine Milchzuckerbouillon verimpft, bei einer Wasserstoffionenkonzentration von 10^{-5} ihre Gärtätigkeit ein, gleichgültig welche Anfangsacidität die Bouillon besessen hat. Diese Endacidität soll etwas niedriger sein als diejenige, die imstande ist, das Bacterium abzutöten. Nach einiger Zeit scheint allerdings (nach eigenen Untersuchungen) diese Endacidität auch die Bakterien abzutöten, obwohl dieses Verhalten variiert und von der finalen Säurekonzentration abhängt.

---

[1]) Zeitschr. f. Kinderheilk. **31.** Nr. 3/4. 1921.
[2]) Zeitschr. f. Kinderheilk. **29.** 1921.
[3]) Jahrb. f. Kinderheilk. **94/95.** 1921.
[4]) *Michaelis* und *Marcora.* Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **14.** 1914.

Während in Deutschland diese Arbeit zunächst keine Nachprüfung oder weitere Fortführung fand, wurden in Amerika während des Krieges von *M. Clark* und *H. A. Lubs*[1]) die Gärungsstudien an Colibacillen, durch *Avery* und *Callam*[2]) an Streptokokken und Pneumokokken, sowie jüngst von *Dernby*[3]) eingehender betrieben. Die schönen Arbeiten, in Deutschland leider nur aus ungenügenden Referaten bekannt, boten Verfasser eine wertvolle Stütze der Ergebnisse, sowie weitere Anregung. Aus diesen Arbeiten geht immer wieder die gänzlich verschiedene Bedeutung der Aciditätsmessung mittels Titration und Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentrationen hervor, die, immer noch nicht genügend beachtet, bei der Einstellung von Nährböden sowie Beurteilung der Endacidität unbedingt Berücksichtigung verdient Kurz seien an dieser Stelle alle die statischen und dynamischen Aciditätsverhältnisse charakterisierenden Eigenschaften eines Mediums angeführt:

1. Zahl der aktiv vorhandenen Wasserstoffionen, gemessen mittels der Gaskette oder geeigneter Indikatoren.
2. Neutralkapazität, d. i. diejenige Menge Lauge oder Säure, die die Lösung bis zur Erreichung des Neutralpunktes, d. i. des Umschlagspunktes der Lackmustinktur verbraucht.
3. Die Äquivalenzkapazität.
4. Das Pufferungsvermögen einer Lösung d. i. die Resistenz, die dieselbe einer Änderung ihrer Acidität, d. h. ihres p_H, durch Zusatz von Säuren (S) resp. Lauge (L) entgegensetzt, exakt definiert durch den Quotienten $\frac{dS}{dp_H}$ bzw. $\frac{dL}{dp_H}$.

Neutralkapazität und Pufferungsvermögen hängen miteinander zusammen, sie werden veranschaulicht durch die Aufstellung einer Titrationskurve, gezeichnet in einem Koordinatensystem mit p_H als Ordinate und den Mengen zugefügter Säure resp. Lauge als Abscisse. Aus dieser Kurve kann man *die „spezielle Kapazität“* ablesen, worunter nach Verfasser die Menge Säuren verstanden sein mag, die von einer bestimmten Ausgangsacidität bis zu einer Erreichung einer festgesetzten Acidität benötigt wird. Diese „spezielle Kapazität“ hat eine besondere Bedeutung für den Verlauf des Gärungsprozesses. Nach obigen Darlegungen muß sie für verschieden gepufferte Lösungen differente Werte ergeben, d. h. verschiedene Säuremengen müssen zur Erreichung derselben Acidität verbraucht werden. Nimmt man nun mit *Michaelis, Scheer* und *Adam* an, daß die Gärtätigkeit erst bei Eintritt derselben Endacität aufhört, so ist zu erwarten, daß *in verschiedenen Nährböden, je nach der Pufferung, verschiedene Säuremengen entwickelt werden.* Diese Verhältnisse haben in einer großen Zahl auch pädiatrischer Arbeiten nicht genügend Beachtung gefunden, teilweise zu Mißdeutungen geführt und biologische Wirkungen dort vermuten lassen, wo rein physikalisch-chemische Vorgänge das Verhalten vielleicht genügend erklären.

Interessant schien es uns besonders, *den gärungssteigernden Einfluß durch Zusatz von Eiweiß* und seinen Abbauprodukten zu den Nährböden, den *Blühdorn*[5]) besonders betont und der auch in der Arbeit von *Wolff* bestätigt wurde, in einfacher, gesetzmäßiger Weise zu deuten. Diese

[1]) Journ. of infect dis. **17**, Nr. 1. 1915; Journ. of biol. chem. **22**, Nr. 1. 1915; Journ. of infect. dis. **17**, Nr. 1. 1915.

[2]) Journ. of exp. med. **29** u. **30**. 1919.

[3]) Ann. de l'inst. Pasteur **35**, Nr. 4. 1921.

[4]) Siehe auch *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration. 2. Aufl., Bd. I. 1922.

[5]) Monatsschr. f. Kinderheilk. Orig. **13**.

Eiweißwirkung hat gerade der Pädiatrie beträchtliches Unbehagen hinsichtlich der Erklärung ihrer therapeutischen Wirkungsweise bereitet und zu Hilfsannahmen Veranlassung gegeben, deren Unterlagen keineswegs befriedigen. Bei Prüfung dieser Frage ergibt sich auch Gelegenheit, festzustellen, ob und wie weit die Konstanz der Endacidität auch für die verschiedensten Nährlösungen gilt und von welchen Faktoren sie abzuhängen scheint. Ferner wird dann auch die Bedeutung der Zuckerkonzentration für den Gärprozeß abgehandelt.

Teil I.

Die Gärungsverhältnisse wurden wie von *E. Wolff* an einer Kultur des Bac. lact. aerogenes studiert. Wichtig erscheint für folgende Ausführung eine Einteilung der Coli aerogenes-Gruppe, die von Amerikanern zuerst von *Smith* angeregt, dann von *Keyes*[1]), *Roger, Clark* und *Davis*[2]) *Evans*[3]) mit exakter Methode begründet wurde. Sie unterschieden 3 Gruppen. Die erste entwickelt, immer unter anaeroben Bedingungen, in einer bestimmten Peptonzuckerlösung CO_2 und H in dem konstanten Verhältnis von ca. 1. „the low ratio organism“. Die zweite entwickelt bedeutend mehr CO_2, so daß der Quotient 1,9—3 beträgt, „the high ratio organism“. Die dritte, endlich seltenste entwickelt fast nur CO_2, „the ∞ (infinitiv) ratio organism“. Die zweite Gruppe zeichnet sich nun auch dadurch vor der ersten aus, daß sie bei derselben Zuckerkonzentration trotz fast gleicher Zuckergärung bedeutend weniger Säure produziert. Auf einem Nährboden von 1% Zuckergehalt wird ein Colibacillus von der Gruppe II also allen Zucker verbrauchen, ehe durch die geringe Säuremenge die hemmende Acidität erreicht ist, während ein Colibacillus der „Low ratio“-Gruppe die Endacidität umgekehrt erreicht, ehe der gesamte Zucker verbraucht ist. Der hier angewandte Stamm gehört der Gruppe der „Low ratio organism“ an.

Die Nährlösungen wurden absichtlich möglichst einfach zusammengesetzt. Außer den in den Versuchsreihen wechselnden Mengen Eiweiß und Zucker wurde nur ein Phosphatgemisch nach *Sörensen*[4]) dem destillierten Wasser zugesetzt; NaCl erwies sich in Vorversuchen als überflüssiger Zusatz. Als Eiweißkörper diente in fast allen Versuchen Witte-Pepton, als Zucker einfacher Rohrzucker. Die Nährlösung wurde in üblicher Weise fraktioniert sterilisiert, die Zuckerlösung vor der letzten Sterilisation zugefügt, nach der Sterilisation p_H mit der Gaskette nach *Michaelis* gemessen, außerdem gegen Phenolphthalein mit $^n/_{10}$-NaOH resp. frisch hergestellte $^n/_{100}$ titriert, bis ein festgesetzter Farbton erreicht war. Die Beimpfung geschah z. T. mit 1 ccm einer 3tägigen Bouillonkultur, z. T. mit einer Platinöse einer 24stündigen Agarkultur. Die Bebrütung fand im Brutofen bei 35° unter aeroben Verhältnissen statt. In bestimmten Zwischenräumen wurden Proben titrimetrisch und elektrometrisch untersucht, dabei gleichzeitig auf Agar ausgestrichen, um eventuell Verunreinigungen zu erkennen, sowie die Lebensfähigkeit der eingeimpften Bakterien zu kontrollieren. Die Ausgangslösungen wurden, soweit die Fragestellung es nicht anders erforderte, durch kleine Mengen HCl, NaOH oder Phosphatgemische auf ein möglichst gleiches p_H eingestellt.

Es ist nicht ganz leicht, die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen nach einzelnen Gesichtspunkten übersichtlich zu ordnen,

[1]) Journ. of med. research **21**, 69. 1909.
[2]) Journ. of infect. dis. **14**, 411. 1914.
[3]) Journ. of infect. dis. 1915, S. 79 u. 135.
[4]) Diese Zeitschr. **21**. 1909.

da alle eng miteinander verknüpft, schwer sich aus einer Gesamtbetrachtung herauslösen lassen. Beobachtet sei zunächst der Einfluß verschiedener Konzentrationen von Pepton. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (*Rahn*[1]), *Blühdorn*, *Wolff* l. c.) ist aus den Versuchen eindeutig zu ersehen, daß Peptonzusatz zu einer Zuckerlösung mit einem Gehalt von ca. 1,5‰ Kaliumphosphat die Säurebildung erheblich steigert. Dieser Phosphatzusatz nach *Sörensen* wurde weniger darum gewählt, um die Lösung auf ein bestimmtes p_H zu regulieren, denn die Pufferwirkung ist in dieser Konzentration relativ zur Peptonlösung zu gering, vielmehr sollte der begünstigende Einfluß des Phosphors auf den fermentativen Vorgang, der in diesen geringen Mengen nach *Ulschinsky* und *Fraenkel* schon optimal zu sein scheint, in allen Versuchsreihen gleichmäßig eingeschaltet werden. Diese Steigerung der Säurebildung durch Peptonzusatz, die an anderen Bakterien ebenfalls häufiger beobachtet wurde, ist in den verschiedensten Nährlösungen regelmäßig nachweisbar und verläuft fast proportional der beigefügten Eiweißmenge. Bisher ist die Steigerung der Säurebildung durch Eiweiß vorwiegend durch das bessere Wachstum der Mikroorganismen infolge Anreicherung an Nährstoffen erklärt worden. Es erscheint nun zweifelhaft, inwieweit eine solche Vermehrung der Bakterien, die, wenn überhaupt regelmäßig nachweisbar, auch durch Pufferung ihre Erklärung finden könnte, in dem Maßstabe, wie sie *Rahn* und *Blühdorn* gefunden, wirklich als der wesentliche Faktor für jenes Phänomen der verstärkten Säurebildung anzusehen ist. Dagegen spricht erstens: in den ersten 6 Stunden, in denen die Menge der fermentativ tätig gewesenen Bakterien eine Million mal geringere gewesen ist, wird mehr als die Hälfte der gesamten Säuremenge produziert. Zweitens: neutralisiert man eine gezuckerte Milch 24 Stunden nach der Beimpfung [*Rahn*, *L. F. Forster*[2]), so wird bei gleicher Zuckeranreicherung in den nächsten 8 Stunden, verglichen mit den ersten 8 Stunden, die Säurebildung trotz der ungeheuer vermehrten Ausgangszahl der Bakterien nicht größer). Nur wird der nach *Forster* die anfängliche scheinbare Stillstandsperiode vermißt, die man bei frischer Beimpfung beobachtet. Es wurde darum an dieser Stelle der Versuch gemacht, experimentelle Stützen für eine andere Erklärung der Eiweißwirkung zu gewinnen, indem der *Einfluß seiner Pufferwirkung* geprüft wurde. Der Gedanke lag nahe, ist auch von anderer Seite (*Freudenberg*, *Adam*, *Clark*) schon berührt worden.

Vorweg sei aus den anderen Ergebnissen dieser Untersuchungen genommen, daß in *zuckerreichen Lösungen von gleicher Ausgangsacidität* bei Beimpfung mit Lact. aerogenes ein konstantes End-p_H erreicht wird, z. B. in einer Nährlösung von 3% Pepton, 5% Rohrzucker und 150tel M.

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. Abt. II, **32**.

[2]) Journ. of bacteriol. **6**. 1921.

Phosphatzusatz. Die spez. „Kapazität“ (s. o.) einer reinen, z. B. 2% Peptonlösung durch Titration mit 0,1 n-Säure bis zu dem wohldefinierten Farbton eines Indicators (γ-Dinitrophenol) wurde bestimmt, der dem konstanten End-p_H der vorgenannten Lösung entspricht, dann wurde in gleicher Weise ein reines Phosphatpuffergemisch ermittelt von derselben spez. Kapazität. Nun wurde einer Zuckerlösung von 1% Pepton und 150tel M. Phosphat Pepton einer- und Phosphat andererseits in solchen Mengen zugesetzt, daß jedesmal dieselbe spez. Kapazität resultierte. Wurden diese Lösungen beimpft, so waren, falls der obige Gedankengang sich bestätigen sollte, nach gleichen Zeiten nicht nur gleiche Acidität, sondern auch die Entwicklung gleicher Säuremengen zu erwarten. Das *Experiment bestätigte vollauf diese Annahme,* auch bei anderen Eiweiß- und Phosphatkonzentrationen (s. Versuchsreihe II und IV). Gegen den Einwand, daß die Steigerung der Säurebildung durch Phosphatzusatz auf anderem Wege, wie durch Eiweiß zustande kommt, nämlich durch eine die Fermentation spezifisch beschleunigende Wirkung des Phosphors, spricht schon die überraschende Genauigkeit, in der sich Phosphat und Eiweiß von gleicher, spezifischer Kapazität vertreten. Um zu zeigen, daß diese Übereinstimmung nicht rein zufällig ist, wurde das Verhalten anderer Puffergemische studiert. Versuchsreihe III zeigt, daß *ein Gemisch von Citrat* (Herstellung nach *Sörensen*) und NaOH in durchaus ähnlicher Weise *die Peptonzugabe zu ersetzen* vermag. Es hieße wohl zu skeptisch sein, wollte man eine neueste Beobachtung von *H.* und *C. Brown*[1]) heranziehen, die eine begünstigende Wirkung der Citronensäure auf das Wachstum der einzelnen Bakterien feststellen, wobei aber eben die Pufferung dieser Substanz nicht berücksichtigt wird [*Jacques Löb*[2])].

Die Wirkung von Pepton bzw. Phosphatzusatz auf die Säurebildung aus Zucker durch Bakterien dürfte folgendermaßen zu erklären sein. Die hier angestellten Experimente (s. u.) zeigen, daß bei gleichzeitiger und gleichmäßiger Beimpfung neutraler Medien trotz gesteigerter Säurebildung *das p_H in der eiweißreicheren, d. h. besser gepufferten Lösung zurückbleibt,* gegenüber der minder gepufferten. In letzterer wird nun rascher eine Acidität erreicht, die die Bakterientätigkeit schwächt, als in der besser gepufferten, die bei gleicher Säurebildung noch ein p_H im optimalen Bereich besitzt und ungestört die Bakterien weiter vergären läßt. Daher bildet sich in dieser Lösung einerseits mehr Säure, andererseits hinkt sie in ihrer Acidität der schlechter gepufferten nach (s. Versuchsreihe I, II, IV). Quantitativ ist diese Auffassung allerdings schwer zu beweisen[3]).

[1]) Lancet **200**, Nr. 1. 1921.

[2]) Journ. of gen. physiol. **1**—**6**.

[3]) Nach Drucklegung angestellte Versuche zeigen, daß bei massiver Beimpfung das Zurückbleiben der Acidität in der besser gepufferten Lösung nach 2 Stunden sehr beträchtlich ist.

In weiteren Versuchen (s. Versuchsreihe XI und XII) ließ sich zeigen, daß sich der *Peptongehalt bis zu einem Minimum von ca.* 1°/₀₀ durch Phosphatpuffergemische gleicher „spezieller Kapazität" ersetzen läßt, ohne daß die Säurebildung vermindert wird; bei einem Gehalt von 0,1°/₀₀ war die Gärtätigkeit zwar verlangsamt, führte aber zu derselben Endacidität; sogar bei gänzlichem Fehlen von Eiweiß ließ sich nach einigen Tagen Säuerung gegenüber einer unbeimpften Kontrollösung nachweisen. Der Stickstoffbedarf der Bakterien ist also schon durch einen Gehalt von ca. 1°/₀₀ Pepton gedeckt. Jeder weitere Zusatz von Pepton steigert die Säurebildung nur durch die ihm eigene Pufferwirkung.

Eine bestimmte Wasserstoffionenkonzentration ist nicht der einzige die Bakterientätigkeit hemmende Faktor, sonst müßte unabhängig von der Ausgangslösung stets dieselbe Endacidität erreicht werden bei Beimpfung mit denselben Bakterien. Nun liegt in *einer besser gepufferten Lösung das End-p_H deutlich* höher (z. B. bei 6% Pepton um 0,4) [siehe auch *Charles Wolf*[1])]. *Auch die Ausgangsacidität* ist von Einfluß auf die Endacidität, z. B. kann eine zu starke Alkalität besonders empfindliche Bakterien von vornherein schädigen, so daß ihr Gärungsvermögen leidet [*H. Jones*[2])]. In anderem Sinn zeigt sich der Einfluß der Ausgangsacidität in folgendem Versuch. Gleich zusammengesetzter Peptonzuckerlösung wurden gleiche Mengen 1. primäres, 2. sekundäres Natriumphosphat und 3. ein Gemisch von beiden in gleicher Konzentration zugesetzt, dieselben dann beimpft. Das End-p_H der Lösung mit primärem Phosphat, also der mit der höchsten Anfangsacidität betrug 4,3, der mit dem Gemisch 4,7, der mit sekundärem Phosphat 4,9. Während im gleichen Nährboden ganz ohne Phosphatzusatz (d. h. minimal gepuffert) trotz relativ niedriger Anfangsacidität eine End-p_H von 4,25 erreicht wurde. Diese Ergebnisse werden durch Zahlen der Versuchsreihe I sowie besonders Versuchsreihe IX bestätigt, in der zur Nährlösung Natrium Lact. einer- und Milchsäure andererseits in gleicher Konzentration zugesetzt wurde. Die Lösung mit der nicht neutralisierten Milchsäure zeigte die höhere Endacidität.

Die Deutung dieser Verhältnisse dürfte auch für die Gärungsvorgänge im Darm nicht ohne Interesse sein. Neben Wasserstoffionenkonzentration wirkt lähmend auf die Bakterien die Anwesenheit von Endprodukten der Gärung, insbesondere von Säuren. Letztere sind mit größter Wahrscheinlichkeit *nur wirksam als freie indissoziierte Säuremoleküle*, während sie nach früheren[3]) wie eigenen Untersuchungen (s. Versuchs-

[1]) Brit. Journ. of exp. pathol. 1921, Nr. 1.

[2]) Journ. of ifect. dis. **26** u. **27**. 1920.

[3]) Siehe darüber *Embden*, diese Zeitschr. **45**, 1912. — *M. E. Collet*, Journ. of exp. zool. 1921, Nr. 1. — *Michaelis* und *Dernby*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 7.

reihe VI und VII) als Ionen die Gärung nicht beeinflussen. Im Verlauf der Gärung steigt mit der Acidität der Anteil freier Säure. Die wachsende Acidität unterstützt also die schädigende Wirkung der gebildeten Säure. Diese Summation eröffnet nun das Verständnis für den Einfluß von Pufferwirkung und Anfangsacidität auf die Endacidität. In besser gepufferten Lösungen wird nämlich infolge bedeutend größerer Säurebildung bei einem höheren p_H schon eine schädliche Konzentration an freier Säure entstehen. Ist ferner die Anfangsacidität schon hoch, so wird umgekehrt ein relativ niedriges, an sich schon lähmendes p_H erreicht, ehe hohe, schädigende Säurekonzentrationen sich bilden. Bei den ziemlich geringen Unterschieden in der Endacidität trotz bedeutender Pufferungsdifferenzen muß aber, wie ein Blick auf die Dissoziationsrestkurve der Milch- und Essigsäure lehrt, ein überwiegender direkter Einfluß der H-Ionen auf das Bacterium angenommen werden.

Nach den Experimenten wirkt gärungshemmend Milchsäure, nur etwas weniger Essigsäure. Salz- und Phosphorsäure sind in den in Betracht kommenden Aciditätsbereichen nicht indissoziiert vorhanden und schon darum unwirksam.

Der Einfluß verschiedener Rohrzuckerkonzentrationen auf die Gärung, der für die Säuglingsernährung erhebliches Interesse beansprucht, wurde in zahlreichen, hier nicht vollständig mitgeteilten Versuchsreihen geprüft. Die Beobachtungen *Wolffs* (l. c.) konnten im wesentlichen *innerhalb gewisser Pufferungsgrenzen* (1—3% Pepton ca. bei minimalem Phosphatzusatz) bestätigt werden. Steigerung der Zuckerkonzentration über 5% bewirkt keine Beschleunigung der Säurebildung, allerdings kann auch von einer Hemmung kaum die Rede sein. Weniger Säure im gleichen Zeitraum wird aber bei Konzentrationen unter 5% gebildet, mit um so steilerem Abfall, je mehr der Zuckergehalt sinkt. Ist nun die Pufferung des Nährbodens größer, so wird infolge schneller Vergärung des Zuckers seine Konzentration rasch verringert und daher die Geschwindigkeit der Säurebildung schon nach kurzer Zeit zugunsten der höher (über 5%) konzentrierten Lösungen verschoben. Zieht man außerdem die beträchtliche Verdünnungssekretion im Magendarmkanal in Rechnung, so wird man der klinischen Schlußfolgerung *Wolffs* großes Bedenken entgegenbringen, daß nämlich eine Zuckeranreicherung der Säuglingsnahrung über 5% die Gärungsprozesse im Darm nicht steigere.

Milchzucker und Maltose werden vom Bact. lactis aerogenes schneller vergoren als Rohrzucker (s. Versuchsreihe VII). Auch die Endacidität hängt, zwar nur wenig, von der Art des Zuckers ab[1]).

Ist das Pufferungsvermögen relativ zur Zuckermenge sehr groß, so kann praktisch aller Zucker vergoren werden, ehe eine die Bakterien-

[1]) *Brown*, Journ. of infect. dis. **15**. 1914. — *Virchow*, zit. nach *Clark*, l. c. *Forter*, l. c.

tätigkeit lähmende Endacidität erreicht. Dann setzt, unter aeroben Verhältnissen (s. Versuchsreihe I, IV, XIV) nach einer Zeit steigernder Acidität *eine rückwärtige Alkalisierung* ein, wahrscheinlich in dem Augenblick, in dem das Gärsubstrat verbraucht ist. Am Colibacillus machte *Clark* dieselbe Beobachtung. In neutraler, zuckerfreier Peptonlösung wurde beim Bact. lact. aerogenes weitere Alkalisierung nur bis $p_H = 8{,}1$ beobachtet [s. auch *Pfaundler*[1])].

Vergleicht man verschiedene Arten von Eiweiß in Nährlösungen auf ihren Einfluß für die Gärung, so sind folgende Umstände zu berücksichtigen. 1. Das Pufferungsvermögen, 2. die Löslichkeit des Eiweißkörpers, beide u. a. in Abhängigkeit vom isoelektischen Punkt. Fällt das Eiweiß z. B. Casein infolge der höheren Acidität aus, so kann es als Bodensatz weiterhin seinen puffernden Einfluß nur ungenügend entfalten. Sorgt man durch wiederholtes Schütteln während der Bebrütung für ständige Durchmischung des Bodensatzes mit der gesamten Nährlösung und beobachtet man peinlich dieselben Vorsichtsmaßregeln bei der Titration, so wird bei gleicher spezieller Kapazität auch dieselbe Säuremenge gebildet werden (s. Versuchsreihe VII f. Casein). Andernfalls wird zwar eine ähnliche Endacidität erreicht, aber die gebildete Säuremenge ist in der Nährlösung mit Bodensatz geringer.

Zusammenfassung.

1. Der Einfluß des Peptons als Vertreter eines Eiweißkörpers auf die Vergärung des Rohrzuckers durch Bact. lact. aerogen, wahrscheinlich auch durch andere Bakterien der Coliaerogengruppe, beruht 1. auf seiner Eigenschaft als Stickstoffträger, 2. auf seiner Pufferwirkung. Zur Befriedigung des N-Bedarfs genügt 1‰ Pepton völlig, jeder weitere Peptonzusatz steigert die Gärung nur durch Pufferwirkung und läßt sich gleichwertig durch Phosphat- oder Citratgemische ersetzen. Für andere Eiweißstoffe gilt prinzipiell wahrscheinlich das gleiche (z. B. Casein), wenn man nur ihre physikalisch-chemischen Konstanten beachtet.

2. Der Gärungsverlauf einer mit Bact. lact. aer. beimpften Peptonzuckerlösung wird besonders durch die jeweilige H-Ionenkonzentration weniger, aber merklich, durch die spezifische Natur der bei der Gärung gebildeten Säuren, z. B. Milch oder Essigsäure beeinflußt, diese wirken schädlich nur als indissozierte Säure.

3. Die Bedeutung der Zuckerkonzentration für die Gärung steht in engem Zusammenhang mit dem Pufferungsvermögen der Nährlösung. Ist dies gering relativ zur Zuckerkonzentration, so bewirkt Steigerung des Rohrzuckergehaltes über 5% keine Beschleunigung der Gärung. Ist es dagegen relativ groß, so tritt bei Beimpfung nach anfänglichem Steigen der Acidität, eine nachträgliche Alkalisierung ein.

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **31.** 1902.

Experimenteller Teil.

Versuchsreihe I.

Kölbchen 1. 0,6 g Pepton (Witte) + 6 ccm Phosphatgemisch (7,4) nach *Sörensen* + 1,5 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 51,9 ccm Aqu. dest.

„ 2. 0,6 g Pepton + 6 ccm Phosph. (7,4) + 7,5 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 45,9 ccm Aqu. dest.

„ 3. 0,6 g Pepton + 6 ccm Phosph. (7,4) + 15 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 38,4 ccm Aqu. dest.

„ 4. 0,6 g Pepton + 6 ccm Phosph. (7,4) + 30 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 23,4 ccm Aqu. dest.

„ 5. 0,6 g Pepton + 6 ccm Phosph. (7,4) + 1,5 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 49,4 ccm Aqu. dest. + 2,5 ccm $^n/_{10}$-HCl.

„ 6. 0,6 g Pepton + 6 ccm Phosph. (7,4) + 30 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 20,9 ccm Aqu. dest. + 2,5 ccm $^n/_{10}$-HCl.

„ 7. 0,6 g Pepton + 6 ccm Phosph. (7,4) + 1,5 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 48,4 ccm Aqu. dest. + 3,5 ccm $^n/_{10}$-HCl + 0,1 n-HCl.

„ 8. 0,6 g Pepton + 6 ccm Phosph. (7,4) + 30 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 19,9 ccm Aqu. dest. + 3,5 ccm $^n/_{10}$-HCl + 0,2 n-HCl.

„ 9. 3,6 g Pepton + 6 ccm Phosph. + 1,5 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 48,9 ccm Aqu. dest.

„ 10. 3,6 g Pepton + 6 ccm Phosph. + 30 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 20,4 ccm Aqu. dest.

„ 11. 3,6 g Pepton + 6 ccm Phosph. + 1,5 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 41 ccm Aqu. dest. + 7,5 ccm $^n/_{10}$-HCl.

„ 12. 3,6 g Pepton + 6 ccm Phosph. + 1,5 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 38 ccm Aqu. dest. + 10,5 ccm $^n/_{10}$-HCl.

Sämtliche Kölbchen rasch hintereinander mit 1 ccm einer 3 tägigen Bouillonkultur beimpft und bei 37° bebrütet. Titrimetrischer Wert auf 10 ccm und 0,1 NaOH bestimmt, p_H mit Gaskette.

Ergebnisse.

	Ausgangsacidität		n. 8 Stdn.		n. 16 Stdn.		n. 24 Stdn.		n. 48 Stdn.	
	titrimetr.	p_H	titrimetr.	p_H[1]	titrimetr.	p_H	titrimetr.	p_H	titrimetr.	p_H
1.	0,82	7,25	1,2	6,1	2,3	4,8	2,15	4,95	1,45	5,3
2.	0,87	7,25	1,75	5,7	2,4	4,65	2,55	4,5	2,55	4,5
3.	0,78	7,25	1,85	5,6	2,35	4,6	2,55	4,5	2,65	4,5
4.	0,82	7,2	1,70	5,7	2,4	4,6	2,5	4,5	2,6	4,5
5.	1,0	6,6	1,6	5,7	2,15	4,5	2,25	4,3	2,2	4,3
6.	1,33	6,0	2,15	5,1	2,6	4,45	2,25	4,35	2,4	4,3
7.	1,75	5,0	2,5	4,9	2,4	4,4	2,4	4,3	2,4	4,3
8.	2,05	4,7	2,05	4,6	2,6	4,35	2,45	4,3	2,5	4,3
9.	3,1	7,2	5,4	6,0	7,5	4,8	5,0	5,1	4,0	5,35
10.	3,3	7,3	5,4	6,0	7,8	4,8	7,5	4,95	7,8	4,75
11.	5,08	6,3	5,5	nicht best.	7,7	4,75	4,5	5,1	3,8	5,4
12.	5,75	5,7	5,9	nicht best.	8,0	4,75	4,2	5,15	3,8	5,4

[1]) Zwischen den einzelnen Bestimmungen liegen ca. 10 Minuten Zwischenraum.

Versuchsreihe II.

Kölbchen 13. 0,1 g Pepton + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 1 ccm Phosphatgemisch (p_H = 7,4) + 8 ccm Aqu. dest.
„ 14. 0,3 g Pepton + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 1 ccm Phosphatgemisch (p_H = 7,4) + 8 ccm Aqu. dest.
„ 15. 0,1 g Pepton + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 5 ccm Phosphatgemisch (p_H = 7,4) + 4 ccm Aqu. dest.
„ 16. 0,4 g Pepton + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 1 ccm Phosphatgemisch (p_H = 7,4) + 8 ccm Aqu. dest.
„ 17. 0,6 g Pepton + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 1 ccm Phosphatgemisch (p_H = 7,4) + 8 ccm Aqu. dest.
„ 18. 0,1 g Pepton + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 10 ccm Phosphatgemisch (p_H = 7,4).

Sämtlich mit 1 Normalöse einer 24stündigen Agarkultur beimpft.

	Ausgangsacidität		n. 5 Stdn.		n. 24 Stdn.	
	0,1 NaOH	p_H	0,1 n-NaOH	p_H	0,1 NaOH	p_H
13.	0,76	7,3	1,43	—	2,35	4,3
14.	1,65	7,3	3,2	—	3,95	4,75
15.	2,15	7,25	3,8	—	4,8	4,8
16.	2,05	7,0	3,85	—	4,65	4,75
17.	3,05	7,25	5,4	—	7,6	4,9
18.	3,0	7,3	5,25	—	7,5	4,9

Versuchsreihe III.

Kölbchen 19. 0,6 g Pepton + 1 ccm 0,1 n-HCl + 1 ccm Phosphatgemisch + 2 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 7 ccm H_2O.
„ 20. 0,1 g Pepton + 2,7 ccm Citrat + 1 ccm Phosphatgemisch + 2 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 3 ccm H_2O + 2,3 ccm $^n/_{10}$-NaOH.
„ 21. 0,1 g Pepton + 4,4 ccm Citrat + 1 ccm Phosphatgemisch + 2 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 3,6 ccm $^n/_{10}$-NaOH.

Mit 1 Normalöse einer 24stündigen Agarkultur beimpft.

	Ausgangsacidität		n. 20 Stdn.	
	0,1 n-NaOH	p_H	0,1 n-NaOH	p_H
19.	4,6	6,8	7,7	4,8
20.	4,8	6,7	7,5	4,95
21.	6,7	6,7	11,4	5,0

Versuchsreihe IV.

Kölbchen 22. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatgemisch (p_H = 8,4) + 2 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 8 ccm Aqu. dest.
„ 23. 0,6 g Pepton + 1 ccm Phosphatgemisch (p_H = 8,4) + 2 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 7,5 ccm Aqu. dest.
„ 24. 0,6 g Pepton + 5 ccm Phosphatgemisch (p_H = 8,4) + 2 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 3,5 ccm Aqu. dest.
„ 25. 0,6 g Pepton + 5 ccm Phosphatgemisch (p_H = 8,4) + 0,2 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 5,3 ccm Aqu. dest.

Mit 1 Normalöse einer 24stündigen Agarkultur beimpft.

	Ausgangsacidität 0,1 n-NaOH	p_H	n. 40 Stdn. 0,1 n-NaOH	p_H	n. 64 Stdn. 0,1 n-NaOH	p_H
22.	0,45	ca. 7,2	2,8	4,6	3,4	4,45
23.	2,4		7,5	5,0	8,6	4,8
24.	4,4		9,9	5,55	11,9	4,9
25.	4,3		8,1	6,35	6,5	6,6

Versuchsreihe V.

Kölbchen 26. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatgemisch + 0,2 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 9 ccm H_2O.

„ 27. 0,6 g Pepton + 1 ccm Phosphatgemisch + 1,0 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 8,5 ccm H_2O.

„ 28. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatgemisch + 4 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 5 ccm H_2O.

Sämtlich mit 1 ccm einer 3 tägigen Bouillonkultur beimpft.

	Ausgangsacidität 0,1 n-NaOH	p_H	n. 6 Stdn. p_H
26.	0,85	6,9	5,7
27.	3,4	7,1	5,7
28.	0,45	7,2	5,4

Versuchsreihe VI.

Kölbchen 29. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatgemisch + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 8 ccm H_2O.

„ 30. 0,4 g Pepton + 1 ccm Phosphatgemisch + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 8 ccm H_2O.

„ 31. 0,1 g Pepton + 5 ccm Phosphatgemisch + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 4 ccm H_2O.

Sämtlich mit 1 ccm einer 3 tägigen Bouillonkultur beimpft.

	Ausgangsacidität p_H	n. 2 Stdn. p_H
29.	7,1	6,4
30.	7,2	6,7
31.	7,15	6,8

Versuchsreihe VII.

Kölbchen 32. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatgemisch + 2 ccm Rohrzuckerlösung (50 proz.) + 8 ccm H_2O.

„ 33. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatgemisch + 1 g Milchzuckerlösung + 9 ccm H_2O.

„ 34. 0,1 g Casein + 1 ccm Phosphatgemisch + 2 ccm Rohrzuckerlösung (50 proz.) + 8 ccm H_2O.

„ 35. 0,1 g Casein + 1 ccm Phosphatgemisch + 1 g Milchzuckerlösung + 9 ccm H_2O.

„ 36. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatgemisch + 1 g Maltose + 9 ccm H_2O.

	Ausgangsacidität		n. 6 Stdn.	n. 18 Stdn.	
	0,1 n-NaOH	p_H	0,1 n-NaOH	0,1 n-NaOH	p_H
32.	2,2	6,5	2,6	4,4	5,35
33.	1,8	6,75	3,75	5,7	5,0
34.[1]	1,4	7,2	2,2	4,2	5,45
35.[1]	1,3	7,2	2,8	5,9	5,05
36.	1,9	7,1	3,4	5,7	5,2

Versuchsreihe VIII.

Kölbchen 37. 0,1 g Pepton + 3 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure + 5 ccm Phosphatgemisch (p_H = 8,2)[2]) + 2 ccm H_2O + 1 g Rohrzucker.

„ 38. 0,1 g Pepton + 3 ccm $^n/_{10}$-Essigsäure + 5 ccm Phosphatgemisch (p_H = 5,2) + 2 ccm H_2O + 1 g Rohrzucker.

„ 39. 0,1 g Pepton + 5 ccm Phosphatgemisch (p_H = 2,0) + 5 ccm H_2O + 1 g Rohrzucker.

Sämtlich mit einer Platinöse einer 24stündigen Agarkultur beimpft.

	Ausgangsacidität		n. 2 Tagen		n. 3 Tagen
	0,1 n-NaOH	p_H	0,1 n-NaOH	p_H	p_H
37.	2,55	6,3	8,2	5,5	5,0
38.	4,0	5,7	8,8	5,3	4,9
39.	3,1	6,3	10,0	4,55	4,55

Versuchsreihe IX.

Kölbchen 40. 0,2 g Pepton + 6 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure + 10 ccm Phosphatgemisch (p_H = 2) + 1 g Rohrzucker + 4 ccm H_2O.

„ 41. 0,2 g Pepton + 6 ccm $^n/_{10}$-Essigsäure + 10 ccm Phosphatgemisch (p_H = 8,2) + 1 g Rohrzucker + 4 ccm H_2O.

„ 42. 0,2 g Pepton + 6 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure + 10 ccm Phosphatgemisch (p_H = 8,2) + 1 g Rohrzucker + 4 ccm H_2O.

Sämtlich mit einer Platinöse einer 24stündigen Agarkultur beimpft.

	Ausgangsacidität		n. 3 Tagen		n. 5 Tagen	
	0,1 n-NaOH	p_H	0,1 n-NaOH	p_H	0,1 n-NaOH	p_H
40.	7,3	5,25	9,6	4,85	9,6	4,8[3])
41.	4,8	6,25	8,1	4,95	7,1	5,35[3])
42.	4,2	6,4	7,7	5,1	7,8	5,1[3])

Versuchsreihe X[4]).

Kölbchen 43 u. 43a. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatgemisch (p_H = 8,2) + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 8 ccm H_2O.

„ 44 u. 44a. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatgemisch (p_H = 8,2) + 5 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 4 ccm H_2O.

Sämtlich mit einer Platinöse einer 24stündigen Agarkultur beimpft.

[1]) Die Kölbchen mit Casein wurden wiederholt umgeschüttelt.

[2]) Phosphatgemisch 8,2 = 8,2 Teile sekundäres Phosphat + 1,8 primäres Phosphat usw.

[3]) Bei Abimpfung auf Zuckeragar wuchsen mäßig viel Bact. lact. aerogen.

[4]) Versuchsreihe X wurde in ähnlicher Weise und mit gleichem Resultat noch wiederholt angestellt. Außerdem wurden Konzentrationen von 0,1—20% titrimetrisch nach 5 Stunden gemessen.

	Ausgangsacidität 0,1 n-NaOH	p_H	n. 6 Stdn. 0,1 n-NaOH	p_H
43.	0,78	nicht bestimmt ca. 7,2	1,8	5,5
43a.	0,80		1,8	5,6
44.	0,76		1,75	5,6
44a.	0,83		1,8	5,45

Versuchsreihe XI.

Kölbchen 45. 5 ccm Peptonlösung (2 proz.) + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 1 ccm Phosphatgemisch ($p_H = 8{,}4$) + 3 ccm H_2O.

„ 46. 2,5 ccm Peptonlösung (2 proz.) + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 3 ccm Phosphatgemisch ($p_H = 8{,}4$) + 3,5 ccm H_2O.

„ 47. 1 ccm Peptonlösung (2 proz.) + 1 ccm Zuckerlösung (50 proz.) + 8 ccm Phosphatgemisch ($p_H = 8{,}4$).

Sämtlich mit einer Platinöse einer 24 stündigen Agarkultur beimpft.

	Ausgangsacidität 0,1 n-NaOH	p_H	n. 18 Stdn. 0,1 n-NaOH	p_H
45.	0,8	7,2	2,2	5,35
46.	1,4	7,15	3,4	5,55
47.	3,1	7,2	6,6	5,45

Versuchsreihe XII.

Kölbchen 48. 1 Tropfen 2 proz. Peptonlösung + 4 ccm Phosphatgemisch (p_H 8,4) + 1 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 5 ccm H_2O.

„ 49. 5 ccm 2 proz. Peptonlösung + 1 ccm Phosphatgemisch (p_H 8,4) + 1 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 3 ccm H_2O.

Beide Kölbchen je mit einer Platinöse einer 24 stündigen Agarkultur beimpft.

	Ausgangsacidität 0,1 n-NaOH	p_H	n. 48 Stdn. 0,1 NaOH	p_H	n. 4 Tagen p_H
48.	0,8	7,2	2,0	6,6	5,55
49.	0,86	7,1	3,2	4,8	5,25

Versuchsreihe XIII.

Kölbchen 50. 2 ccm Peptonlösung (2 proz.) + 5 ccm Phosphatgemisch ($p_H = 8{,}4$) + 4 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 9 ccm H_2O.

„ 51. 10 ccm Phosphatgemisch ($p_H = 8{,}4$) + 4 ccm Zuckerlösung (40 proz. + 6 ccm H_2O.

„ 52. Ebenso wie 51 als Kontrolle.

50 und 51 mit einer Platinöse einer 24 stündigen Agarkultur beimpft, 52 als Kontrolle unbeimpft.

	Ausgangsacidität 0,1 n-NaOH	p_H	n. 24 Stdn. 0,1 n-NaOH	p_H	n. 48 Stdn. p_H	n. 72 Stdn. p_H
50.	1,15	7,35	4,7	5,4		4,85
51.	1,6	7,2	2,4	7,0	6,95	6,85
52.		7,15		7,15		7,1

Versuchsreihe XIV.

Kölbchen 53. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatpuffer ($p_H = 8$) + 1 ccm Zuckerlösung (40 proz.) + 8 ccm H_2O.

„ 54. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatpuffer ($p_H = 8$) + 1 ccm Zuckerlösung (4 proz.) + 8 ccm H_2O.

„ 55. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatpuffer ($p_H = 8$) + 1 ccm Zuckerlösung (0,4 proz.) + 8 ccm H_2O.

„ 56. 0,1 g Pepton + 1 ccm Phosphatpuffer + 9 ccm H_2O.

Sämtlich mit einer Platinöse einer 24stündigen Agarkultur beimpft.

	Ausgangsacidität		n. 18 Stdn.		n. 2 Tagen	
	0,1 n-NaOH	p_H	0,1 n-NaOH	p_H	0,1 n-NaOH	p_H
53.	0,8	7,0	2,6	5,4	3,0	4,65
54.			1,7	6,05	2,1	5,55
55.	ungefähr	ungefähr	1,35	6,3	1,15	6,55
56.			0,56	7,45	0,06	8,1

Untersuchungen über den wachstumfördernden Faktor des Citronensaftes.

I. Mitteilung.

Auf welche Weise läßt sich der bakterienwachstumfördernde Faktor in dem Citronensaft durch physikalische, chemische, kolloid-chemische Methoden beeinflussen?

Von

Bruno Leichtentritt und **Margarete Zielaskowski.**

(Aus der Universitätskinderklinik Breslau.)

(Eingegangen am 1. Mai 1922.)

Im vorigen Jahre hat der eine von uns[1] [2]) den Versuch gemacht, die Bedeutung der akzessorischen Nährstoffaktoren im Sinne *Hopkins* und *Hofmeisters* auf das Gebiet der Bakteriologie zur Anwendung zu bringen. Dabei leitete ihn der Gesichtspunkt, die wachstumsfördernden Faktoren dieser Stoffe für ein beschleunigtes Bakterienwachstum nutzbar zu machen, um auf diese Weise die Bakteriologie am Krankenbett, die mit ihrer Diagnose oft dem klinischen Befunde und einem sich daraus ergebenden aktiven Eingreifen nachhinkt (Diphtherie-Typhus-Meningokokken-Diagnose) zum ausschlaggebenden Faktor eines ätiologischen Handelns zu machen. Es ließ sich der Befund erheben, daß der Zusatz von Stoffen, die sich durch ihren ansatzfördernden Gehalt im Tierversuch und in der Klinik als wirksam erwiesen hatten, zu unseren üblichen Nährböden, Bouillon und Agar, eine Erhöhung der Wachstumsintensität bewirkt. Auf Agar + Citronensaft bzw. Malzextrakt oder durch Autolyse gewonnenen Mohrrübenextrakt ließ sich ein Staphylokokkenstamm aus einem Osteomyelitiseiter züchten, der auf den üblichen Nährböden, auf Agar-, Blut-, Serum-, Ascitesplatte, nicht zum Wachstum zu bringen war.

Bereits nach 8 Stunden war auf der Extraktstoffplatte ein Wachstumsbeginn festzustellen, nach 10 Stunden waren einzelne Kolonien zu identifizieren. Als Kontrolle wurde Agar mit verschiedenen Kohlenhydratzusätzen, Saccharose, Glykose, Maltose, verwandt, um die Zuckerwirkung auszuschließen.

---

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1921, S. 631.

[2]) Verhandl. d. Ges. f. Kinderheilk. Jena 1921. — Monatsschr. f. Kinderheilk. 1921, S. 22.

Die Versuche fielen stets zugunsten der Extraktstoff- und der Citronensaftplatte aus. Bei weiteren Versuchen zwecks Begünstigung des Bakterienwachstums arbeitete *L.* vor allem mit der Citrone, in der der Zucker nur in kleinen Mengen enthalten ist (in 100 ccm sind nach *Bornträger* 0,75 g Invertzucker und 0,19 g Rohrzucker enthalten). Zu seinem Studium verwandte er vor allem Diphtheriebacillenstämme, die weder auf Agar, noch auf Ascites wuchsen. Da nicht alle Stämme in gleicher Weise anspruchsvoll sind, mußten jedesmal vor Beginn der Versuche entsprechende Wachstumskontrollen angestellt werden. Bei Diphtheriestämmen, mit denen auf Agar und Ascites, sowie auf Nährböden mit Zusatz der oben angeführten Zucker ein kümmerliches oder gar kein Wachstum zu erzielen war, ließ sich auf Agar, dem 0,5 ccm alkalisierte frische Citrone zugesetzt wurde, bereits nach 6 Stunden ein schwaches, nach weiteren 12 Stunden ein intensives Wachstum wahrnehmen, nach 8 Stunden ergab das mikroskopische Bild eine ausgesprochene Tingierung der *Babes-Ernst*schen Körperchen. Morphologisch waren die Bakterien gegen die Kontrolle auf der Serumplatte nicht wesentlich verändert; sie waren vielleicht etwas kürzer und plumper, bisweilen traten frühzeitig Keulenformen auf. Seinen Erfahrungen nach hatte die Methode durchaus für die praktische Diphtheriediagnose eine Bedeutung, da in einer großen Zahl untersuchter Fälle in der gleichen Zeit wie auf der Serumplatte der Bacillennachweis gelang. Dabei hatte man den Vorteil, mit einem durchsichtigen Nährboden zu arbeiten, bei dem man von der Beschaffung des Rinder- und Hammelserums unabhängig wird. *L.* betonte ausdrücklich, daß die Citronenplatte die Serumplatte nicht an Wirksamkeit übertrifft, wie es überhaupt zunächst nicht in seiner Absicht lag, die für die Diphtheriediagnose vorhandenen Nährböden um einen neuen zu bereichern. Vielmehr kam es ihm in seiner ersten Mitteilung darauf an, durch die Züchtung des Staphylokokkenstammes und der Diphtheriebazillen eine Brücke zu schlagen zwischen Empirie und Theorie, da die Bakteriologie zu Züchtungszwecken sich rein empirisch akzessorischer Nährstoffe schon immer bedient (Fleischextrakt, Blut, Serum, Ascites, Eiter, Milch, Eier, Organe, Bakterienstoffwechselprodukte, Bierwürze, Pflaumenmus, Malz, Hefe, Pilzextrakte). Deshalb verzichtete er zunächst darauf, nachzuprüfen, wie die einzelnen Bakterienarten sich den akzessorischen Nährstoffaktoren gegenüber verhielten, eine Lücke, wie sie später unter gegebenen Verhältnissen noch auszufüllen ist.

Durch Zufall wurde uns ein zweiter Staphylokokkenstamm in die Hände gespielt, der ebenfalls einem osteomyelitischen Eiter entstammte. Wenn auch hier auf der Ascitesplatte nach 48stündiger Bebrütung sich ein schwaches Wachstum entwickelte, so war es doch ganz offensichtlich, daß die Staphylokokken, genau wie im ersten Fall, mit großer Beschleunigung und Wachstumsintensität auf der Citronenplatte zur Darstellung gelangten.

Auf jeden Fall ist es beachtenswert, daß wieder der Erreger einer Osteomyelitis größere Anforderungen an einen Nährboden stellte, und es erscheint notwendig, auf den Zusammenhang der Knocheneiterungen hervorrufenden Staphylokokken und deren Ansprüche an den Nährboden zu achten. Auf Versuche, Typhus-, Paratyphusbacillen usw. beschleunigt zum Wachstum zu bringen, wollen wir in einer besonderen Mitteilung eingehen[1]).

Wir machten ferner den Versuch, auf unter dem gleichen Prinzip zusammengesetzten Nährböden Spirochaeta pallida aus den Organen dreier luetischer Kinder unmittelbar post mortem zu züchten. Bisher wurden keine eindeutigen Resultate erzielt; die Arbeit wird fortgesetzt. Ebenso Versuche zur Züchtung der Spirochaeta ictero-haemorrhagica. Außerdem suchten wir auf Lebertrannährböden aus tuberkelbacillenhaltigem Sputum eine Reinkultur zu züchten. Man hatte nach ca. 5 Tagen den Eindruck, als ob die Bacillen sich vermehrt hätten; doch zu einem richtigen Wachstum ist es nicht gekommen. Auch diese Versuche werden weitergeführt.

Um auszuschließen, daß irgendwelche chemisch zu fassenden Faktoren eine Begünstigung des Bakterienwachstums auf der Citronenplatte hervorriefen, *setzten wir dem Agar Kochsalz, Soda, Kalisalze* (die ja in der Pflanze eine große Rolle spielen und auch in der Skorbutfrage als ätiologischer Faktor einstens angeschuldigt wurden), *Asche der Citrone* (*auch in chem. reiner Citronensäure gelöst*) *zu, um auf diese Weise den Einfluß der unorganischen Bestandteile auf das Wachstum zu studieren. Die Resultate fielen sämtlich negativ aus. Über den negativen Erfolg von Zuckerzusätzen zum Agar haben wir bereits oben gesprochen. Das gleiche Resultat hatten Zusätze von Eiweißabbauprodukten* (*u. a. Tryptophan*) *und Citronensäure. Abderhalden* und *Wertheimer*[2]) gelangten auf andere Weise zu dem gleichen Ergebnis; auf ihre diesbezügliche Mitteilung werden wir später noch einmal zurückkommen. Sie prüften den Einfluß des Citronensaftes, der Citronensäure, von NaCl auf den Sauerstoffverbrauch von roten Blutkörperchen. Während die atmungsfördernde Wirkung des Citronensaftes sehr ausgesprochen ist (O_2-Verbrauch im Kubikzentimeter = 293), beträgt sie bei *Ringer*scher Lösung nur 65, bei Citronensäure 98. — Da es zweifelhaft erscheint, wie weit man das wirksame Prinzip im Citronensaft durch Vergleich mit chemisch bekannten Stoffen fassen kann, suchten wir auf umgekehrtem Wege die Citrone durch Einwirkungen der verschiedensten physikalischen und chemischen Methoden in ihrer Wirksamkeit zu schädigen. Über die Ergebnisse wollen wir im folgenden berichten:

Zu dem Hauptcharakteristicum des antiskorbutischen Faktors *C* gehört seine Thermolabilität. Man hatte die Beobachtung gemacht [*Neumann*[3]), *Conzetti*[4])],

---

[1]) *Leichtentritt* und *Zielaskowski*, zur Zeit im Druck.
[2]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **192**, 174. 1921.
[3]) *Leyden-Klemperer*, Dtsch. Klin. Bd. **7**.
[4]) *Conzetti*, Pediatria 1909, 463.

daß seit der Einführung der *Soxhlet*schen Milchsterilisation ein Anwachsen der Zahl der barlowkranken Kinder erfolgte und daß rohe Milch geradezu als Heilmittel anzusehen war. Wenn auch im Laufe der Jahre von diesem Satze nicht mehr alles aufrechtzuerhalten ist, weil man die Barlowerscheinungen unter Umständen selbst bei Verabreichung gekochter Milch zurückgehen sah — nur muß die Bezugsquelle gewechselt werden —, weil man ferner die Beobachtung machte, daß das Schädliche nicht das Erhitzen an sich, sondern offenbar das fraktionierte Erhitzen ist, wie es sich gerade unter der Not des Weltkrieges in Deutschland und Österreich herausgebildet hatte, schließlich das Alter der Milch — ob Sommer-, ob Wintermilch —, konservierende Zusätze, Schütteln auf dem Transport, kurz eine Unzahl von Momenten bedeutungsvoll sind, so ist doch nicht daran zu zweifeln, daß die Hitze dem Faktor *C* unzuträglich ist. Die Arbeiten *Axel Holsts* und *Fröhlichs*[1,2,3]), sowie amerikanische Forschungen, haben mit aller Deutlichkeit gezeigt, daß offenbar die den Faktor *C* enthaltenden Substanzen nicht immer in gleicher Menge und Qualität antiskorbutische Stoffe aufweisen. *Holst* und *Fröhlich* zeigten, daß durch 1stündiges Kochen bei 100° Karotten und Blumenkohl in ihrer antiskorbutischen Wirkung völlig, Weißkohl nur wenig, Multeebeeren gar nicht geschädigt werden. Löwenzahn hat in frischem Zustande eine sehr starke antiskorbutische Wirksamkeit und wird durch Kochen erheblich geschädigt, wesentlich weniger dagegen büßen weiße Rüben und Kohlrabi ein, die in frischem Zustande dem Löwenzahn an Wirksamkeit stark nachstehen. Kocht man bei Temperaturen von 100—200°, so wird die Wirksamkeit des Weißkohls, der, wie wir oben erwähnten, bei gewöhnlicher Hitze wenig leidet, völlig zerstört. Preßt man Weißkohl- und Löwenzahnblätter aus, so genügt ein Erhitzen des Saftes von 10 Minuten bei 60—100°, um seine Wirkung illusorisch zu machen. Dagegen verträgt Himbeer-, Citronen- und Orangensaft auch ein längeres Erhitzen anstandslos. Diese Unterschiede werden mit dem differenten Säuregehalt der einzelnen Antiskorbutica erklärt: Ein Zusatz von 2‰ Salzsäure zum Löwenzahnsaft, von $^1/_2$% Citronensäure zum Weißkohlsaft wirkt trotz des Kochens konservierend auf die antiskorbutischen Fähigkeiten. Die Verhältnisse liegen hier zweifellos sehr wenig übersichtlich. Denn es ist sicher, daß nicht nur die Dauer und der Grad der Erhitzung eine Rolle spielen, sondern auch noch Momente, ob das Erhitzen der Früchte und Gemüse in ursprünglicher Form oder als Preßsaft statthat. Auch scheint die Ausgangsreaktion ein bedeutsamer Faktor zu sein, wenn letztere auch nicht überschätzt werden darf, wie eigene Versuche beweisen. Von ausschlaggebender Bedeutung ist sicher die ursprüngliche Menge eines Nahrungsstoffes an antiskorbutischen Substanzen. Im Lister-Institut in London hat man unter Leitung von *Hopkins, Harriette Chick* und *Dalyell*[4]) den Versuch gemacht, die einzelnen Nahrungsmittel quantitativ am Meerschweinchen und Affen auszutitrieren und nach akzessorischen Nährstoffeinheiten, also nicht bloß nach dem Gehalt an Faktor *C*, sondern auch an *A* und *B*, einzuteilen. Citronensaft und Orangensaft haben den höchsten Gehalt an Faktor *C*; dafür wird, nach Einheiten gerechnet, die Zahl 100 angenommen. Frischer Tomatensaft wird mit 60 bezeichnet, frisch gekeimte Hülsenfrüchte mit 30, frischer Mohrrübensaft mit 7,5, frischer Rindfleischsaft und trockene Hülsenfrüchte mit weniger als 7,5, frische rohe Kuhmilch auffallenderweise mit nur 1,5, wobei alle Bedenken, die wir oben bei der Untersuchung der Milch äußerten, in Betracht zu ziehen sind.

[1]) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten **72, 75. 1912.**

[2]) *Fröhlich*, Ebenda **72.** 1912.

[3]) *Fürst*, Ebenda **72.** 1912.

[4]) Wien. klin. Wochenschr. **51.** 1919. — Report on the Present State of Knowledge concerning Accessory Food Factors. Medical Research Committee, London 1919.

Zum Studium des Bakterienwachstums hatten wir uns also des wirksamsten Antiskorbuticums, des Citronensaftes, bedient. Wachsen Diphtheriebacillen auf Agar, dem statt frischen alkalisierten Citronensafts durch Kochen beeinflußter hinzugeben wird? Zu diesem Zwecke wurde saurer Citronensaft, sowie mit einer konzentrierten Sodalösung alkalisierter Saft 1 Stunde im Rückflußkühler bei 100° gekocht. Der saure Saft wurde nach dem Kochen alkalisiert und dann in vorschriftsmäßiger Menge zu Platten verarbeitet. Als eindeutiges Resultat ergab sich bei großen Versuchsreihen: *ein 1 stündiges Kochen von Citronensaft bei 100° schädigt nicht nur nicht das Wachstumsresultat; man hat sogar den Eindruck, daß das Wachstum auf den Platten mit gekochtem Saft das auf den Originalplatten etwas übertrifft.* Auch *Abderhalden* und *Wertheimer* machten in ihren, bereits oben erwähnten, Atmungsversuchen die gleichen Erfahrungen. Selbst nach 4stündigem Kochen ist die atmungsfördernde Wirkung unverändert lebhaft, wenn auch die Kochbeständigkeit durch das Neutralisieren verloren geht. Im Bakterienversuch ist es allerdings irrevelant, bei welcher Reaktion der Kochprozeß vor sich geht. Bei zu starker Alkalescenz tritt Wachstumsbehinderung ein.

Diese Versuche sind in gewisse Parallele zu setzen mit Arbeiten von *Freudenberg*[1]) und *Györgi*[2]), die zur Prüfung des Vitamingehaltes verschiedener Stoffe die Oxydationsbeeinflussung gewisser Gewebe, z. B. Kalbsdarmzellen und Kalbsblut, bezw. Kaninchenleberzellen und Kaninchenblut, benutzten. Im Mohrrübensaft sind antiskrobutische und zellatmungsfördernde Stoffe vorhanden. Durch die Einwirkung von Wärme, die nicht zu lange ausgedehnt ist, wird bei saurer Reaktion die Atmungsförderung gesteigert, bei alkalischer Reaktion vernichtet. Also nur bei Veränderung der Reaktion sehen wir einen Unterschied in der atmungs- und bakterienwachstumsfördernden Wirkung. Die Förderung der Gewebsatmung stellt vielleicht ein feineres Reagens als das Bakterienwachstum dar. Daß in dem bei nicht zu stark alkalischer Reaktion gekochten Citronensaft die antiskorbutischen Stoffe nicht zerstört sind, geht daraus hervor, daß es uns gelang, selbst wenn man die Dauer des Kochens auf 2 Stunden erhöhte, einen typischen Fall von kindlichem Skorbut innerhalb von $2^1/_2$ Woche bei einer täglichen Darreichung von 25 ccm zur Heilung zu bringen. In ähnlichem Sinne sprechen Tierversuche, auf die wir in einer 2. Mitteilung[3]) zurückkommen. *Nobel*[4]) heilte 7 Barlowfälle mit 10 Minuten bis 1 Stunde lang gekochter Milch

[1]) Monatsschr. f. Kinderheilk. 1921, S. 22. — Verhandl. d. Ges. f. Kinderheilk. Jena 1921.

[2]) Jahrb. f. Kinderheilk. **94**, 55. 1921.

[3]) *Leichtentritt* und *Zielaskowski*, folgende Mitteilung in dieser Zeitschrift.

[4]) Zeitschr. f. Kinderheilk. **28**, 5.

und vertritt die Ansicht, daß das antiskorbutische Vitamin durch Hitze nicht zu zerstören ist. Zu gleichen Resultaten kommt *Delf*[1]), die keinerlei zerstörenden Effekt durch Erhitzen von Orangensaft auf 100° feststellt, während Rübensaft durch die gleiche Art der Erhitzung 2fach, Kohlsaft $7^1/_2$fach geschwächt wird. Neutralisation des Orangensaftes ($p_H = 5,2$ bis 6,8) vor der Erhitzung ist für den Faktor *C* irrelevant. *Zilva* fällt mit kohlensaurem Kalk die Säure aus dem Citronensaft, ohne den antiskorbutischen Faktor zu verändern. Die Säure des Saftes kann also nicht allein der Grund für die schwere Zerstörbarkeit durch Hitze sein. In Einklang damit stehen die Untersuchungen von *Dutcher*, *Harshaw* und *Hall*[2]).

In weiteren Versuchen setzten wir den Citronensaft einer 1stündigen Autoklavenwirkung aus, bzw. hydrolysierten den Saft im Autoklaven bei einer Konzentration der Salzsäure bzw. Natronlauge von 2—3%. Tabelle I erläutert diesen Vorgang.

Tabelle I.

Resultat nach 20 Std. abgelesen		Saurer frischer Citronensaft, *1 Std. im Autoklaven* alkalis.	Saurer frischer Citronensaft, *mit HCl 1 Std. im Autoklaven* erhitzt, alkalis.	Saurer fricher Citronensaft, *mit NaOH 1 Std. im Autoklaven* erhitzt, alkalis.	*Saurer frischer Citronensaft* alkalisiert	Kontrolle auf Asciteplatte	Kontrolle auf Agarplatte
Versuch I							
Citronen-zusatz	0,5	6	7	4	6	0	0
	1,0	6	8	4	6	0	0
Versuch II							
Citronen-zusatz	0,7	5	5	3	6	0	0
	1,2	6	5	4	6	0	0

Die Zahlen in dieser, wie in den folgenden Tabellen, sind der Ausdruck der Wachstumsintensität auf den Agarplatten, denen jeweils aus der Tabelle zu ersehende Mengen behandelten Citronensaftes zugesetzt sind, derart, daß 0 = kein, 1 = schwaches, 2 = stärkeres Wachstum usw. bedeuten. Es ist klar, daß die Bezeichnung des Wachstumsgrades, bzw. Fortschrittes, rein subjektiv ist, also auch nur annähernde Resultate darstellen kann. Bei unseren Versuchen handelte es sich um Reihenversuche, d. h. ein und dieselbe Platte wurde immer nach einer Anzahl von Stunden auf ihren Wachstumsfortschritt kontrolliert; deshalb mußte von den genaueren gewichtsanalytischen Bestimmungen der jeweiligen „Bakterienernte" abgesehen werden.

Die aus den Tabellen abzulesende Stundenzahl ist nicht sehr hoch angegeben, da z. B. nach 36, 48, 72 Stunden die Platten „nachholen", also Wachstumsunterschiede wesentlich schwerer zu erkennen sind[3]).

[1]) Biochem. Journ. **14**, 211. 1920.

[2]) Journ. of biol. chem. **47**, 3, 483. 1921.

[3]) Es wäre zu erwägen, ob nicht das „Nachholen" der Bakterien auf einem Aktivieren der fraglichen Stoffe durch die Bakterien selbst beruht.

Die wirksame Menge des zuzusetzenden Saftes hatten wir austitriert (vgl. Mitteilung *Leichtentritt*); dabei stellte sich heraus, daß z. B. 0,1 Citronensaft wesentlich unwirksamer als 0,5 ccm ist. Die gleiche Beobachtung konnten wir in sämtlichen Versuchen machen: die „oligodynamische Wirkung" der akzessorischen Nährstoffe besteht nicht zu Recht; nicht das Minimum, sondern das Optimum dieser Stoffe ist für den wirkungsvollen Effekt auszutitrieren. *Freise*[1]) hat in seinen Versuchen u. a. darauf hingewiesen; beim experimentellen Meerschweinchenskorbut ist diese Tatsache bekräftigt worden, und auch die amerikanischen Autoren haben sich dies zu eigen gemacht. Dieses Gesetz des Optimums läßt Schlüsse auf die Natur der „Vitamine" zu, vielmehr läßt sich danach sagen, daß die Auffassung über ihre Wirkungsart entsprechend den „Fermenten", die bereits in kleinsten Mengen wirken, einer Revision zu unterziehen ist. Andererseits zeigte uns der Bakterienversuch, daß das Optimum nie ein Maximum war: es war fast irrelevant, ob wir den Platten 0,5 ccm oder 1,0 ccm zusetzten.

Zusammenfassung: *Im Autoklaven behandelter Citronensaft hat an wachstumsfördernder Wirkung nichts eingebüßt. Bei Hydrolyse mit Salzsäure im Autoklaven sehen wir das gleiche Resultat, während bei Hydrolyse mit Lauge eine geringe Wachstumsabschwächung statthat.* Diese Versuche werden durch Experimente am Tier noch vervollständigt (vgl. Mitteilung 2). Bei der Hydrolysenwirkung durch Säure müssen wir an die Versuche von *Holst* und *Fröhlich* erinnern, die gewisse Gemüse durch Vorbehandlung ihrer antiskorbutischen Fähigkeiten beraubt haben, die sie nach Salzsäurezusatz wiedererlangten. Allerdings war in diesen Versuchen der Säuresatz um vieles schwächer ($2^0/_{00}$ HCl).

Wir versuchten in der weiteren Folge unserer Arbeit den bakterienwachstumsfördernden Faktor in der Citrone durch *Bestrahlung mit ultraviolettem Licht* zu zerstören. Wir gingen von folgender Versuchsanordnung aus: in einer Entfernung von 30 cm vom Strahlenkranz der Höhensonne setzten wir drei Kölbchen *a*, *b*, *c* der Lichtwirkung $^3/_4$ Stunden lang aus:

Kölbchen *a* enthielt saure Citrone;
„ *b* „ „ „ , die während der ganzen Bestrahlungszeit gekocht wurde;
„ *c* enthielt alkalische Citrone, die während der ganzen Bestrahlungszeit gekocht wurde.

Resultat: *Unabhängig von der Reaktion, ob sauer oder alkalisch, wird Citronensaft durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, gleichgültig, ob gleichzeitig erhitzt wird oder nicht, in seiner das Bakterienwachstum begünstigenden Eigenschaft nicht gehemmt.* Diese Versuche stellen eine Bestätigung der Resultate des Engländers *S. Zilva*[2]) dar. Dieser be-

[1]) Jahrb. f. Kinderheilk. **91**, 79. 1920.
[2]) Biochem. Journ. **13**, 164. 1919.

strahlte Originalcitronensaft 8 Stunden mit ultraviolettem Licht, ohne eine Wirkung auf den Faktor *C* zu sehen. Ebensowenig wurde autolysierte Hefe beeinflußt, während der fettlösliche Faktor *A* der Butter inaktiviert wird. Dieselbe Wirkung ließ sich erzielen, wenn Butter in dünner Schicht dem diffusen Tageslicht ausgesetzt wird (oxydativer Prozeß — Wirkung der ultravioletten Strahlen).

Im Zusammenhang damit haben wir sauren Citronensaft für 10 Minuten der Wirkung von *Röntgenstrahlen* ausgesetzt (Abstand von 37 cm 2,2 MA. 104—108 Sp. H. M. ohne Filter und Tubus). *Die wachstumsfördernde Wirkung der Citrone wird nicht geschädigt.*

In der englisch-amerikanischen Literatur hatte sich eine ausgedehnte Diskussion wegen der Thermoresistenz des Faktors *A* erhoben. Nach Arbeiten von *Steenbock, Boutwell* und *Kent*[1]), *Drumond*[2]) sowie *Hopkins*[3]) ist eindeutig erwiesen, daß *A* Temperaturen selbst höherer Grade verträgt; *Osborne* und *Mendel*[4]) hatten offenbar bei ihren Versuchen nicht die Gegenwart von O_2 berücksichtigt. Leitet man nämlich O_2 z. B. durch Butter, so wird der Faktor *A* schon bei Temperaturen von 80° zerstört. Die obenerwähnten Versuche von *Zilva* deuten in die gleiche Richtung.

In welcher Weise wirkt der Einfluß von Lüftung und Kochen auf den antiskorbutischen Faktor C? Leitet man nach den Angaben der Literatur Luft bei normaler Temperatur 12 Stunden durch Citronensaft, so tritt beim Meerschweinchen bei einer täglichen Gabe von 3—5 ccm Skorbut auf, bei einer Gabe von 7 ccm wird er verhindert. Kocht man Citronensaft und leitet gleichzeitig Luft hindurch, so entsteht bei 1, 2, 3, 6 ccm bei einem Meerschweinchen Skorbut, während, Citrone in CO_2-Atmosphäre gekocht, Skorbut verhindert, d. h. Kochen + O_2-Durchleitung schwächen die Wirkung des antiskorbutischen Faktors ab. Zu ähnlichen Resultaten kommen *Ellis, Steenbock* und *Hart*[5]), ferner *Dutscher, Harshaw* und *Hall.* Aus eigenen Versuchen können wir zu der Frage sagen:

Leitet man O_2 durch saure Citrone und alkalisiert nachher, so hat diese Lüftung auf das Bakterienwachstum nicht den geringsten Effekt. Das gleiche negative Resultat wird erzielt bei Kochen von saurer bzw alkalisierter Citrone und gleichzeitigem O_2-Durchleiten. Es ergibt sich hier ein zweifelloser Unterschied zwischen der Prozedur des Kochens + Lüftens beim antiskorbutischen Faktor im Tierversuch und im Bakterienwachstum. Auf den Zusammenhang wollen wir in unserer zweiten Mitteilung eingehen.

Bei dem nächsten Versuch sehen wir einen ähnlichen Unterschied; vielleicht spielt hier neben der Sauerstoffatmosphäre und der Außentemperatur noch die relative Feuchtigkeit der Luft eine Rolle:

[1]) Zit. nach *Hopkins*, Biochem. Journ. **14**, 725. 1920.
[2]) Biochem. Journ. **14**, 734. 1920.
[3]) Brit. med. Journ. **147**, 3109. 1920.
[4]) Zit. nach *Hopkins*, Biochem. Journ. **14**, 725. 1920.
[5]) Journ. of biol. chem. **46**, 2. 367. 1921.

Setzt man sauren Citronensaft 4 Tage lang in offener Schale auf den Brutschrank, so ist er in seiner Wirksamkeit auf das Bakterienwachstum nicht geschädigt; ebensowenig geht nach *Abderhalden* und *Wertheimer* nach 4stündigem Stehen die atmungsfördernde Wirkung des Saftes verloren. *Der Meerschweinchenversuch fällt dagegen völlig negativ aus* (vgl. 2. Mitteilung). Dieser Gegensatz ist interessant, wissen wir doch, daß das „Stehenlassen“ vielleicht ein Ausdruck des „Alterns“ ist, bei dem die Stoffe sich umlagern und leicht zerfallen.

Bei der Milch spielt dieses Moment, wie schon erwähnt, eine bedeutende Rolle; auch bei den Enzymen tritt diese Eigenschaft deutlich hervor; z. B. verliert das Trypsin im trockenen Zustande mit der Zeit seine Wirksamkeit. *Hess*[1]) wies darauf hin, daß z. B. 35 g frische, im Gegensatz zu 35 g gelagerten, Karotten imstande sind, ein Meerschweinchen vor Skorbut zu schützen. Nach *Axel Holst* und *Fröhlich* büßt ausgepreßter Weißkohl- und Löwenzahnsaft bei Zimmertemperatur seine antiskorbutischen Eigenschaften ein. Auch *Hofmeister*[2]) konnte ähnliche Beobachtungen machen: Im Oxypyridin glaubt er die chemisch wirksame Substanz des antineuritischen Faktors rein dargestellt zu haben, da polyneuritiskranke Tauben nach Injektion dieses Stoffes zur Heilung kamen. Dies trat nicht ein, als das Oxypyridin eine Zeitlang gestanden hatte. Als Erklärung hierfür sah er eine Umlagerung aus der wirksamen Ketoform in die unwirksame Enolform an.

Unser Versuch ist deshalb von Bedeutung, weil man berechtigten Zweifel hegen muß, ob es möglich ist, Citronen- und Apfelsinensaft, selbst nach noch so vorsichtiger Trocknung, in eine Dauerform zu bringen. Nach Friedensschluß hatten die Amerikaner die Absicht, Deutschland, das sich infolge der Blockade in einem Präskorbutstadium befand, tonnenweise mit Apfelsinen- und Citronensaft in Tablettenform zu überschwemmen. Auch *Harden* und *Robison*[3]), die anfänglich sehr optimistisch hinsichtlich der Wirkung eines Dauerpräparates waren, haben ihre Erwartungen nach dem Ausfall der jüngsten Tierversuche wesentlich niedriger gestellt und sprechen nur noch von dem Erhaltensein eines Vitamingehaltes von 15, höchstens 50%.

Unsere weiteren Untersuchungen beschäftigten sich damit, ob es möglich wäre, durch *Adsorption* aus dem Citronensaft die wirksame Substanz zu eliminieren. Über Adsorption und akzessorische Nährstoffe ist in der Literatur nur wenig bekannt. Nach *Seidell*[4]) wird beim Schütteln des Filtrates von autolysierter Bierhefe mit *Lloyds* Reagens (Colloide alluminium silikat oder Tonerde (Fullers earth) das gesamte in der Lösung enthaltene „Vitamin“ adsorbiert. *Byfield*[5]) berichtet, daß durch mit Kaolin adsorbiertem Orangensaft bei nicht gedeihenden Säuglingen der

[1]) Journ. of the Americ. med. assoc. **76**, 11, 697. 1921.

[2]) Ergebn. d. Physiol. **16**, 1 u. 510.

[3]) Biochem. Journ. **15**, 4, 521. 1921.

[4]) Zit. nach *Abderhalden* und *Schaumann*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **172**, 85. 1918.

[5]) Americ. Journ. of dis. of childr. **19**, 5, 349. 1920.

Erfolg vermißt wird, während vom unfiltrierten Saft schon 15 ccm genügen, um die Gewichtskurve ansteigen zu lassen. Nach *Harden* und *Zilva*[1]) wird Orangensaft durch Tonerde und Ferrum dialysatum nicht adsorbiert. Nimmt man gleiche Teile von Hefe und Orangensaft, so ist Tonerde imstande, den antineuritischen Faktor *B* zu entfernen im Gegensatz zum antiskorbutischen Faktor *C*. Wir benützten in erster Linie als Adsorbentien Kaolin, ferner Kohle, Talkum, Koks, Stärke und Asbest. Bei unseren weiteren Arbeiten ließen wir aus äußeren Gründen die drei letzteren fort. Wir möchten zunächst über die Kaolinversuche berichten:

10 ccm Citronensaft werden mit ca. 5 ccm Kaolin bei Zimmertemperatur zum Teil 3, zum Teil 24 Stunden lang, adsorbiert, dann filtriert. Zu 15 ccm Agar werden 0,2, bzw. 0,5 ccm Filtrats hinzugefügt, vom Rückstand 2, bzw. 4 Ösen willkürlicher Größe.

Bei der Untersuchung gingen wir aus vom:

1. originären sauren Citronensaft,
2. alkalisierten Citronensaft,
3. sauren gekochten und nachher alkalisierten Citronensaft,
4. alkalisch gekochten Citronensaft.

Die Alkalisierung erfolgte mit einer gesättigten Na_2CO_3-Lösung; die Ablesung der Platten nach 18, bzw. 36 Stunden, wobei hervorzuheben ist, daß richtig verwendbar bloß das Resultat nach 18 Stunden ist, da die Platten, die zu dieser Zeit Wachstumsunterschiede aufwiesen, häufig in den späteren Ablesungen im Wachstum nachgeholt haben. Das Resultat dieses Versuches zeigt:

Beim sauren Citronensaft, sowohl im originären als gekochten, Zustand fand sowohl auf dem Filtrat- als den Rückstandplatten kein Wachstum statt; die saure Reaktion erklärt dies eindeutig.

Bei den drei anderen Versuchsreihen übertrafen, besonders bei der Ablesung nach 18 Stunden, *die Platten mit frischer Citrone zweifellos im Wachstum die Filtratplatten: d. h. das Kaolin scheint imstande zu sein, die das Bakterienwachstum begünstigende Substanz aus dem Citronensaft zu adsorbieren.*

Wir sind uns bei diesem Vorversuch bewußt, mehrere Fehler gemacht zu haben; denn 1. müßten Adsorptionsversuche mit viel größeren Mengen angestellt werden, als wir dies der enormen Teuerung der Citronen wegen[2]) imstande waren auszuführen, 2. wären umfangreiche quantitative Untersuchungen bei verschiedenen Konzentrationen notwendig gewesen, da das Kennzeichen einer Adsorption ein starker Entzug der gelösten Substanz aus verdünnten Lösungen, ein relativ geringer Entzug aus konzentrierten Lösungen ist. Auch davon mußten wir mit Ausnahme der angegebenen Verdünnungen aus äußeren Gründen absehen.

[1]) Biochem. Journ. **12**. 93. 1918.

[2]) Aus dem gleichen Grunde mußten wir davon Abstand nehmen, die wirksame Substanz mit Alkohol, Äther, Essigäther, Amylalkohol, Aceton auszuschütteln. Versuche mit kleinen Mengen ergaben keine eindeutigen Resultate.

Die nebenstehende große Tabelle enthält ein Beispiel aus großen Versuchsreihen, die wir im Laufe der Monate angestellt haben. Es werden die Resultate von drei Versuchen mitgeteilt, bei denen zur Berücksichtigung kam:

Die Beeinflussung des Citronensaftes durch:

1. Höhensonne,
2. Lüftung,
3. Röntgenbestrahlung und worauf es im Zusammenhang mit den unmittelbar besprochenen Versuchen besonders ankommt:
4. durch Adsorption mit Kaolin nach Vorbehandlung des Saftes in der Weise, wie es von 1—3 angegeben ist. Zur Ausführung der Adsorption wurden die einzelnen Versuchskölbchen 5 Stunden im Schüttelapparat geschüttelt. Als Kontrollen dienten uns Platten von Agar, Ascites, Wasseragar, d. h. ein Agar, in dem Aq. dest. das Fleischwasser ersetzt, um die eventuell wirksamen akzessorischen Faktoren darin auszuschließen, ferner Platten, denen Soda, bezw. Kochsalz, bzw. chemische reine Citronensäure, bzw. Asche des Citronensaftes zugesetzt wurde.

Tabelle II.

Platten nach durchschnittlich 24 Std. nachgesehen	Alkal.frische Citrone			Saure Citrone, O_2 durchgeleit. alkalisiert			Saur. Citr., gekocht, O_2 durchgeleitet alkal.			Alkal. Citr. gekocht, O_2 durchgeleit.			Saure Citr., $^3/_4$ Std. unter Höhensonne alkalisiert			Saure Citr., gekocht u. gleichzeitig $^3/_4$ Std. unter Höhensonne alkalisiert		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Ausgangsmaterial . .	6	7	5	6	5	4	6	7	6	5	5	1 (zu stark alk.)	5	8	4	6	3	—
Adsorption mit Kaolin:																		
Filtrat . . .	5	2	1	5	3	4	5	6	1	5	5	1	5	6	4	4	2	—
Rückstand .	6	7	4	7	6	1	6	7	6	6	4	1	6	6	1	7	7	—
	Agar			Wasseragar			Agar + 0,5 Asche von Citronensaft			Wasseragar + 0,5 Asche von Citronensaft			Ascites					
Kontrollplatten . .	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	0	1			

Platten nach durchschnittlich 24 Std. nachgesehen	Alkalisierte Citrone, gekocht und gleichzeitig $^3/_4$ Std. Höhensonne			Saure Citrone Röntgenstr. alkalisiert			Na_2CO_3			NaCl			Citronensäure		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Ausgangsmaterial . .	5	4	—	6	4	—	2	0	1	2	1	1	2	—	—
Adsorption mit Kaolin:															
Filtrat . . .	4	1	—	3	4	—	2	0	0	1	1	1	3	—	—
Rückstand .	8	3	—	7	2	—	3	1	1	2	1	2	4	—	—

Zusammenfassung: *Die Versuche 1—7 stimmen mit denjenigen Resultaten überein, wie wir sie schon oben besprachen.*

Kaolin ist imstande, dem Citronensaft, gleichgültig, wie er vorbehandelt ist, einen Teil seiner wirksamen Substanz zu entziehen.

Bei den folgenden fünf Versuchen wurde die Adsorptionskraft von Kohle und Talkum geprüft. Wir können es uns ersparen, eine ausführliche Tabelle zu bringen. Wir gingen folgendermaßen vor:

A	Talkum:	Citronensaft,	sauer, 12 Stunden kalt ads., alkalisiert, filtriert.
B	„	„	alkalisch, 12 Stunden kalt ads., filtriert.
C	„	„	sauer gekocht[1]), ads., alkalisiert, filtriert.
D	„	„	alkalisch, gekocht, ads., filtriert.
E	Kohle:	„	behandelt wie A.
F	„	„	„ „ B.
G	„	„	„ „ C.
H	„	„	„ „ D.

Resultat: *Kohle und Talkum sind imstande, zum Teil die das Bakterienwachstum begünstigende Substanz aus dem Citronensaft zu adsorbieren. Talkum bevorzugt die Behandlung B: alkalische Reaktion und Adsorption in der Kälte und Behandlung C: saure Reaktion und Adsorption in der Hitze und nachherige Alkalisierung. Kohle bevorzugt alkalische Reaktion und Adsorption in der Hitze.*

Diesen Versuch können noch zwei weitere Versuche ergänzen, die bereits früher angeführt wurden: die Behandlung des Citronensaftes im Autoklaven, bzw. nach vorhergehender Hydrolyse durch Salzsäure oder Natronlauge- und die nach der eben angeführten Vorbehandlung des Saftes noch mit Kohle adsorbiert wurden. Dieser Versuch stimmt gut mit dem eben besprochenen überein, *denn Kohle adsorbiert aus alkalischem Citronensaft in der Hitze Teile der wirksamen Substanz.*

Zusammenfassung: *Kaolin, Talkum und Kohle sind unter bestimmten Bedingungen imstande, die wirksame Substanz aus dem Citronensaft zum Teil zu adsorbieren.*

Diese nicht völlige Entziehung der wirksamen Substanz durch Adsorption findet sich auch in anderen Gebieten der Biologie. *W. Roux* und *Yersin*[2]) konnten durch Aluminiumhydroxyd, bzw. Tierkohle, in einer Lösung von Diphtherietoxin das Gift schwächen, ohne daß es gelang, die Lösung völlig zu entgiften. *K. Landsteiner*[2]) und seine Schüler schüttelten Tetanustoxin mit Kaolin; in der Lösung blieb stets ein Giftrest zurück.

Unsere Versuche stehen im Gegensatz zu denen von *Harden* und *Zilva*, die mit Tonerde und Ferrum dialysatum den antiskorbutischen Faktor *C* aus der Citrone nicht entfernen konnten. Es handelt sich hier unserer Auffassung nach nicht um einen prinzipiellen Unterschied in den

[1]) Das Adsorbens wird während des Aufwallens der Flüssigkeit hinzugefügt, wobei längeres Kochen vermieden wird.

[2]) Zit. nach *Bechhold*, Die Kolloide usw. Dresden 1912.

Adsorbentien; wir sind der Meinung, daß der das Bakterienwachstum fördernde Faktor in Gleichklang zu bringen ist mit dem Stoff, der, durch Kaolin adsorbiert, den Gewichtsanstieg beim Säugling zum Stillstand bringt, wie es *Byfield* beschreibt. *Diese Versuche lassen die Vermutung aufkommen, daß in dem Citronensaft neben dem antiskorbutischen Faktor C noch ein zweiter enthalten ist, der auf den Anwuchs nicht gedeihender Säuglinge, sowie das Wachstum anspruchsvoller Bakterienarten, seine Wirkung entfaltet.* (Näheres darüber in der Mitteilung 2.)

Als weitere kolloidchemische Methode wandten wir die *Dialyse* an. Es war von Bedeutung festzustellen, ob ein Unterschied zwischen dem Hülseninhalt und dem Dialysat des Citronensaftes in der Einwirkung auf das Bakterienwachstum besteht. Als Dialysierschläuche verwandten wir die von *Schleicher* und *Schüll* in den Handel gebrachten, die wir auf Eiweißundurchlässigkeit und möglichst gleichmäßige Durchlässigkeit für Pepton prüften. Bereits *Eykmann*[1]) konnte im Jahre 1906 feststellen, daß der antineuritische Faktor dialysabel ist. Zu gleichen Resultaten kommen *Shiga* und *Kusama*[2]), während *Axel Holst* und *Fröhlich* über Vorversuche nicht hinauskommen. Es zeigte sich nämlich, daß nach einer 3—4tägigen Dialyse die meisten der prophylaktischen Eigenschaften eines Antiskorbuticums verloren gingen (Weißkohlsaft bzw. Lime juice).

In unseren Versuchen hatten wir mit ähnlichen Schwierigkeiten zu kämpfen (vgl. Mitteilung 2) und glauben, daß diese Erfahrung in das gleiche Kapitel gehört wie das Zugrundegehen des antiskorbutischen Faktors *C* im Citronensaft bei Zimmertemperatur (das „Altern" des ausgepreßten Saftes), worüber wir oben berichteten. — Aus der neueren Literatur liegt, soweit wir sie übersehen, nur eine Arbeit über die Dialyse von *Zilva* und *Miura*[3]) vor. Der antineuritische wie auch der antiskorbutische Faktor dialysieren durch Membranen, wobei die Permeabilität der Hülse von der verschiedenen Porengröße abhängt. Eine mit 95proz. Alkohol vorbereitete Membran läßt den Faktor *C* durchdialysieren, im Gegensatz zu der mit 90proz. Alkohol vorbereiteten, wie sich aus Tierversuchen ergab. Die Dialyse ist also als Differentialdiagnosticum für die beiden Faktoren unverwendbar; vielmehr läßt sie nur den Schluß zu, daß es sich um Semikolloide handelt.

Bei der Vorbereitung unserer Hülsenversuche verfuhren wir nach den Vorschriften *Abderhaldens*[4]).

Auf die Einzelheiten geht die Mitteilung II ein.

---

[1]) Arch. f. Hyg. **58**, 150.
[2]) Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. 1911, Beiheft.
[3]) Biochem. Journ. **15**, 422. 1921.
[4]) Abwehrfermente, Berlin 1913.

Tabelle III.

Zusatz	Frische Citrone alkalisiert	Hülseninhalt	Dialysat	Kontrollen	
				Agar	Ascites
0.6	6	3	5	0	1
1.2	6	3	5		

Als Resultat ergibt sich aus Tabelle III:

Nach 4tägiger Dialyse hat der Hülseninhalt seine bakterienwachstumsfördernde Wirkung beträchtlich eingebüßt, während die wirksame Substanz größtenteils dialysiert ist.

Schlußsätze:

1. Es wird der Versuch gemacht, die im Citronensaft enthaltene bakterienwachstumsfördernde Wirkung durch physikalische, chemische, kolloidchemische Methoden auszuschalten.

2. Erhitzung des Citronensaftes auf 100°, auch fraktioniert, evtl. im Autoklaven wirken eher wachstumsfördernd als -hemmend.

3. Die Reaktion bei der Erhitzung, ob sauer oder alkalisch, spielt keine wesentliche Rolle.

4. Die Hydrolyse bei einer Konzentration der Salzsäure von 2–3% ist nicht wachstumsschädigend, im Gegensatz zu der mit Natronlauge.

5. Bestrahlung des Citronensaftes mit ultraviolettem Licht und Röntgenstrahlen ist wirkungslos, auch wenn gleichzeitig unter verschiedener Ausgangsreaktion Hitze einwirkt.

6. Lüftung mit gleichzeitigem Kochen des Citronensaftes ist unwirksam.

7. Stehenlassen der Citrone bei Zimmertemperatur schwächt die wachstumsfördernde Wirkung nicht ab.

8. Bei Behandlung des Citronensaftes mit Adsorbentien, Kaolin, Kohle, Talkum ließ sich die bakterienwachstumsfördernde Wirkung schwächen, wenn auch nicht völlig vernichten. Die Vorbehandlung des Citronensaftes ist dabei irrelevant.

9. Der größte Teil der bakterienwachstumsfördernden Substanz dialysiert, unabhängig von der saueren Reaktion; der Hülseninhalt ist beträchtlich abgeschwächt.

Untersuchungen über den wachstumfördernden Faktor des Citronensaftes.

II. Mitteilung.

Vergleiche zwischen dem Meerschweinchen- und Bakterienplattenversuch.

Von

Bruno Leichtentritt und Margarete Zielaskowski.

(Aus der Universitätskinderklinik Breslau.)

(Eingegangen am 1. Mai 1922.)

Mit 9 Abbildungen im Text.

In unserer ersten Mitteilung[1]) konnten wir über Versuche berichten, die darauf hinzielten, eine Charakterisierung des bakterienwachstumfördernden Faktors des Citronensaftes mit physikalischen, chemischen und kolloidchemischen Methoden zu erreichen, weil man zur Zeit noch nicht in der Lage ist, die wirksame Substanz chemisch rein darzustellen. Die Resultate unserer Arbeit waren, daß weder durch Hitze noch durch Erhitzung unter Druck, unabhängig von der Reaktion, ein positives Ergebnis, d. h. eine Hemmung des Bakterienwachstums zu erzielen war. Ebenso negativ war die Beeinflussung des Citronensaftes durch ultraviolettes Licht, Röntgenstrahlen, Lüftung allein und mit gleichzeitigem Erhitzen, tagelanges Lagern. Einzig und allein die Adsorption des Saftes mit Kohle, Kaolin bzw. Talkum vermochte seine bakterienwachstumsfördernde Wirkung zu schwächen, wenn auch nicht völlig zu isolieren. Außerdem ließ sich die Feststellung machen, daß der größte Teil dieser Substanz dialysiert wurde, während der Hülseninhalt beträchtlich an Wirksamkeit einbüßte.

Es interessierte uns die Frage, wieweit diese auf der Agarplatte gewonnenen Resultate mit dem Meerschweinchenversuch in Übereinstimmung zu bringen wären. *Axel Holst* und *Fröhlich*[2]) hatten gezeigt, daß man im Meerschweinchen ein skorbutempfindliches Tier par excellence hatte. Wir wollten prüfen, inwieweit der durch die oben angeführten Prozeduren in seiner das Bakterienwachstum fördernden Wirkung wenig geschädigte Saft auch Tiere vor Skorbut zu schützen vermag. Aus dem positiven Ausfall der Versuche wäre evtl. ein Schluß auf den Charakter des Stoffes in der Citrone, der das Bakterienwachstum begünstigt, zu

[1]) *Leichtentritt* und *Zielaskowski*, vgl. vorige Mitteilung in dieser Zeitschrift.
[2]) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1912, 72 u. 75.

ziehen. Dann hätte man den nicht hoch genug zu schätzenden Vorteil, an Stelle des kostspieligen und lang dauernden Tierversuchs in die Biologie zur Prüfung von Stoffen auf antiskorbutische Eigenschaften den Bakterienplattenversuch einführen zu können. Man könnte dem antiskorbutischen Faktor mit einer gewissen Berechtigung den bakterienfördernden an die Seite stellen. Fiel der Bakterien- und Tierversuch aber nicht gleichsinnig aus, was ja bei der durchaus verschieden begründeten biologischen Anspruchsfähigkeit des pflanzlichen und tierischen Organismus zu erwarten stand, so war die Möglichkeit gegeben, einen fördernden Einblick in die Wirkung verschiedenartiger akzessorischer Nährstofffaktoren zu gewinnen; dabei könnte sich vielleicht auch die Berechtigung eines wachstumfördernden Faktors herauskrystallisieren.

Die zu unserem Versuch verwendeten Meerschweinchen waren junge Tiere, die ein Durchschnittsgewicht von 200—250 g nicht überschritten. Sie wurden unter den für den Tierstoffwechselversuch erforderlichen Bedingungen gehalten. Als Nahrung diente Hafer und 4 g Trockenmilch eines Fabrikates, das schon lange gelagert war und das sich, wie der Versuch ergab, frei vom antiskorbutischen Faktor C erwies. Die Milch wurde von den Tieren, solange die Krankheit noch nicht zu weit vorgeschritten war, gern genommen. Zum Saufen stand ihnen Wasser reichlich zur Verfügung. Der jeweils verschieden behandelte Citronensaft wurde nicht unter ihr Futter gemengt; nach dem Vorbilde von *Hopkins*[1]) reichten wir ihn den Tieren gesondert, täglich zur bestimmten Stunde, nach Reinigung der Käfige und nach dem Wiegen. Da durchschnittlich nur 5 ccm des betreffenden Saftes verabfolgt wurden und infolgedessen die Tiere beim Trinken aus einem Schälchen den Saft verschmiert hätten, fanden wir *als Methode der Wahl die Verfütterung mit Pipetten*, die wir den Tieren in den Mund einführten und an denen sie saugten. Zwar zeigte sich auch hier ihre individuelle Verschiedenheit, indem der eine Teil von vornherein willig in der kürzesten Zeit den angebotenen Saft austrank, während der andere zunächst erheblichen Widerstand leistete, der erst nach einer Reihe von Tagen gebrochen wurde. Schließlich gewöhnten auch sie sich an den Fütterungsmodus, und nur 3 Tiere blieben konstant in der Verweigerung der Citronensaftaufnahme, so daß sie als ungeeignet aus unseren Versuchsreihen gestrichen werden mußten.

In der Literatur schwanken die Angaben über die Mengen des Meerschweinchen vor Skorbut schützenden Citronensaftes zwischen 1 und 10 ccm. Es ist ganz zweifellos, daß unter Umständen schon die kleinen Mengen ausreichen, um das Tier zu schützen. Wir aber gaben als Mindestquantum 5 ccm. Wir gingen dabei von der Überlegung aus, daß ein in seiner Konstitution stark veränderter Saft gereicht wurde; außerdem hatten unsere eigenen Erfahrungen, sowie die Arbeiten *Freises*[2]), *Abderhaldens*[3]), *Arons*[4]) und *Byfields*[5]) den Satz von der oligochemischen

---

[1]) Zit. nach *Stepp*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **15**, 258.

[2]) Jahrb. f. Kinderheilk. **91**, 79. 1920.

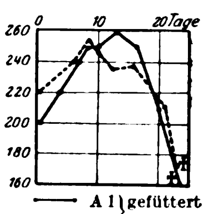
[3]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **188**, 60. 1921.

[4]) Verhandl. d. Ges. f. Kinderheilk., Jena 1921. — Monatsschr. f. Kinderheilk. 1921, 22.

[5]) Americ. Journ. of dis. of childr. **19**, 349. 1920.

Wirkung der Vitamine erschüttert. Daher wollten wir nicht ein Minimum, sondern ein Optimum anbieten, zumal es bei den leidigen Tierverhältnissen unmöglich war, die Wirkung quantitativ auszutitrieren.

Kurve 1 dient als Beispiel dafür, wie eine Nahrung aus Hafer und Trockenmilch auf Meerschweinchen skorbuterzeugend wirkt. Bis 5 bzw. 6 Tage ante exitum war die Nahrungsaufnahme der Tiere gut. Aber bereits zu dieser Zeit bestanden Gangstörungen als erste Anzeichen des Skorbuts und starke Druckempfindlichkeit, besonders an den unteren Epiphysen der Femora. Das Aussehen der Tiere wurde matt, das Fell struppig und unter dem charakteristischen Gewichtssturz kamen sie ad exitum. Dabei war auffallend, daß sie schon 2 Tage vor dem Tode sich kalt anfühlten. Wenn wir auch keine Temperaturmessungen vornahmen, so muß hier die Körpertemperatur erheblich herabgesetzt gewesen sein. *Abderhalden*[1]) und seine Schule haben darauf hingewiesen, daß die Gewebsatmung der Skorbuttiere in genau der gleichen Weise herabgesetzt ist wie die der an Dystrophie leidenden Tauben, daß andererseits Antiscorbutica, v. a. Citronensaft und Orangensaft, imstande sind, die Gewebsatmung beträchtlich zu fördern. Gleichsinnige Versuche wurden von *Freudenberg*[2]) und *Györgi*[3]) angestellt. Bei der Autopsie der Tiere der Kurve 1 fand sich neben einer Bronchopneumonie eine starke Verdickung der Knorpelknochengrenzen, auch bereits makroskopisch kleine Blutungen. An den unteren Extremitäten, die beim Herauspräparieren an der unteren Femurepiphyse sowie an der oberen Tibiaepiphyse brechen, sind in der Muskulatur unter den Sehnen reichlich Blutungen vorhanden. (Die mikroskopischen Knochenuntersuchungen haben wir bisher noch nicht ausgeführt, da die Befunde makroskopisch absolut typisch waren; das Material ist konserviert und wird bei nächster Gelegenheit verarbeitet.) Der Dickdarm ist mit blutigen Massen erfüllt, ein Befund, der selten ist und auf den *Abderhalden* erst neuerdings hingewiesen hat.



—— A 1 } gefüttert
------ A 2 } mit Hafer
+ 4 g Trockenmilch.
Tod erfolgte an Skorbut am 27. bzw. 26. Tage. Bis 6 bzw. 5 Tage ante exitum gute Nahrungsaufnahme. Zu dieser Zeit stellten sich auch erste Gangstörungen ein, mattes Aussehen der Tiere.

Kurve 1.

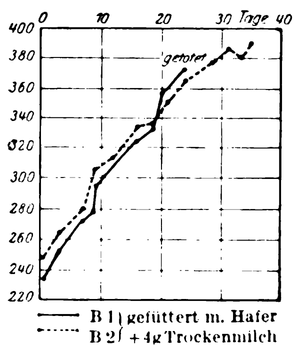
Als Kontrolle dazu zeigt Kurve 2, wie 5 ccm frischer alkalisierter Citronensaft als Zulage zur Hafer-Trockenmilchfütterung ein glänzendes Gedeihen der Tiere verbürgt. Tier B 2 lebt noch am 36. Tage des Versuches, nachdem es in dieser Zeit ca. 160 g zugenommen hat. Auffallend ist seine ausgezeichnete Fettentwicklung. Tier B 1, das eine fast noch

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **191**, 278. 1921.

[2]) Verhandl. d. Ges. f. Kinderheilk., Jena 1921. — Monatsschr. f. Kinderheilk. 1921, 22.

[3]) Jahrb. f. Kinderheilk. **94**, 55. 1921.

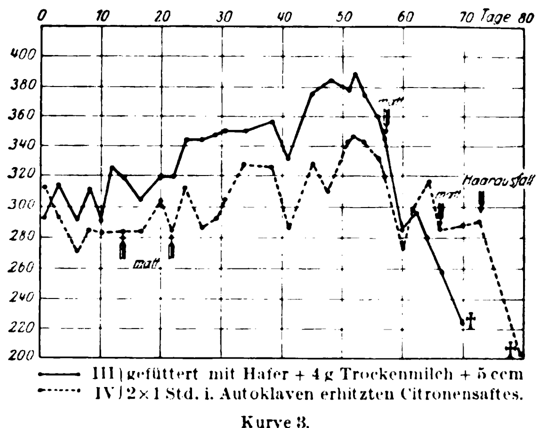
steilere Gewichtskurve aufweist, wird am 27. Tage, zur Zeit, wo die Kontrolltiere der Kurve 1 an Skorbut zugrunde gegangen waren, getötet. Es weist keinerlei Spuren von Skorbut auf. *Beachtenswert ist auch hier, worauf wir mit allem Nachdruck hinweisen wollen, die enorme Entwicklung der Fettdepots in der Subcutis, im Netz und in den Schenkel- und Achselbeugen.* Hier kam uns ganz besonders die ansatzfördernde Wirkung der Citrone zum Bewußtsein, wobei es gleichgültig ist, ob wir ihre Wirkung und die der akzessorischen Nährstoffaktoren überhaupt als Reizstoffe auf den Ernährungsvorgang und Zellstoffwechsel [*Aron*[1])] ansehen, oder sie in Beziehung bringen zur Zellatmung, die für die Oxydationsvorgänge unerläßlich ist (*Abderhalden, Freudenberg, György*) oder sie mit *Bürgi*[2]) und *Uhlmann*[3]) als pharmakologisch wirksame Substanzen mit tonisierendem Einfluß auf das cerebrospinale und parasympathische Nervensystem betrachten, oder schließlich sie mit *Bickel*[4]) für den „Assimilator“ der Körperzellen halten.



B 1 } gefüttert m. Hafer
B 2 } + 4 g Trockenmilch
+ 5 g alkalis. frischer Citrone.
B 1 wurde am 27. Tage getötet (cf. A 1 u. A 2). Kein Skorbut. große Fettdepots. B 2 lebte am 86. Tage noch bei bestem Wohlbefinden.

Kurve 2.

Bei unseren weiteren Versuchen prüften wir den Einfluß der Hitze auf den Saft (vgl. Mitteilung 1). Die bestehende Ansicht geht dahin, daß sich beim Erhitzen des Citronensaftes auf 100° keine schädigende Wirkung bemerkbar macht. Angaben aus der Literatur beweisen, daß Tiere, mit einem solchen Saft ernährt, vor Skorbut bewahrt bleiben. Auf die Versuche *Nobels*[5]), der sieben Barlowkinder mit Milch ernährte, die 10 Minuten bis 1 Stunde erhitzt war, ist ebenso



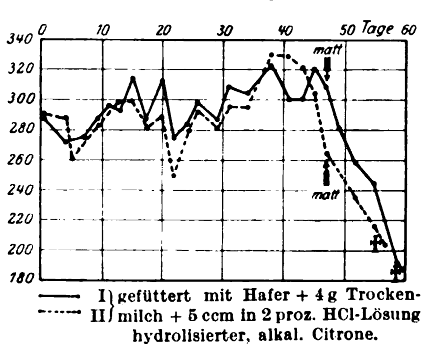
III } gefüttert mit Hafer + 4 g Trockenmilch + 5 ccm
IV } 2 × 1 Std. i. Autoklaven erhitzten Citronensaftes.

Kurve 3.

[1]) Monatsschr. f. Kinderheilk. **13**, 359 u. **15**, 561.
[2]) Dtsch. med. Wochenschr. 1921, S. 613.
[3]) Zeitschr. f. Biol. **68**, 419.
[4]) Klin. Wochenschr. 1922, S. 110.
[5]) Zeitschr. f. Kinderheilk. **28**, 5.

hingewiesen wie auf die von uns beobachtete Heilung eines Skorbutfalles mit 2 Stunden bei alkalischer Reaktion gekochtem Citronensaft. Uns interessierte der Einfluß des fraktionierten Erhitzens im Autoklaven. Kurve 3 gibt darüber Aufschluß.

Das Auffallende an der Kurve ist zunächst, daß beide Tiere relativ lange leben. Der Tod von M 3 erfolgt am 69., von M 4 am 78. Tage. M 3 wurde erst am 57. Tage etwas matt, zu einer Zeit, wo die Nahrungsaufnahme noch durchaus gut war, stürzte aber dann, nachdem es in der vorhergehenden Versuchsperiode relativ gut an Gewicht zugenommen hatte, enorm ab und kommt ad exitum. Bei der Sektion finden sich typisch aufgelockerte Femurepiphysen und verdickte Ringknorpel, dagegen keinerlei Blutungssymptome. M 4 hatte nicht so gut an Gewicht zugenommen und war in der Zeit zwischen 12. und 20. Tage recht matt geworden, so daß wir damals schon annahmen, daß sich ein Skorbut vorbereite. Es erholte sich aber wieder und bekam die ersten Anzeichen seiner Erkrankung erst am 67. Tage, während ein stärkerer Haarausfall erst am 76. Tage einsetzte. Bei der Sektion findet sich hier das typische Bild des Skorbuts mit reichlichen Muskelblutungen.



—— I } gefüttert mit Hafer + 4 g Trocken-
------ II } milch + 5 ccm in 2 proz. HCl-Lösung hydrolisierter, alkal. Citrone.
I am 61. Tage, II am 59. Tage an typischem Skorbut gestorben.
Kurve 4.

Unsere Angaben werden in allen Punkten von *Mauricand* und *Michel*[1]) bestätigt. Ihre Tiere, die zu einer Kost aus Hafer und Heu 5—10 ccm $1^1/_2$ Std. im Autoklaven bei 120° gehaltenem Citronensaft erhielten, erkrankten sogar erst zwischen dem 85. und 110. Tage an Skorbut. Auch sie sprechen von einem relativ chronischen Verlauf, der spontane Besserung zuläßt (vgl. M 4). Trotz guten Allgemeinzustandes und Körpergewichtszunahme verenden ihre Tiere schließlich skorbutisch. Das, was bei der Milch zweifellos den Skorbut des Beobachtungstieres herbeigeführt hätte, das wiederholte Erhitzen unter Druck, bewahrt unsere Tiere bei Darreichung von Citronensaft für über 2 Monate vor der Erkrankung. Ein Beweis mehr, um wieviel überlegener an antiskorbutischen Einheiten [*Chick* und *Dalyell*[2])] der Citronensaft der Milch ist.

Zusammenfassung: *Meerschweinchen werden durch Citronensaft, der 2 mal 1 Stunde im Autoklaven erhitzt ist, für eine lange Zeit (über noch einmal so lange als die Kontrolltiere ohne Citrone) vor Skorbut geschützt. Allerdings läßt sich schließlich der Ausbruch der Krankheit nicht verhindern.*

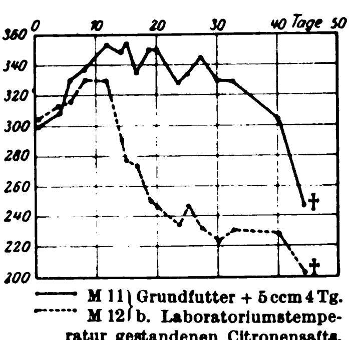
Eine ähnliche Beobachtung können wir aus der Kurve 4 ablesen. M 1 und M 2 bekommen als Zulage zu ihrem Futter Saft, der unter Zu-

[1]) Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **84**, 14, 735. 1921.

[2]) Zeitschr. f. Kinderheilk. **26**, 257. 1920.

satz von Salzsäure in einer Konzentration von 2—3% im Autoklaven hydrolisiert wurde. Auch hier ein relativ langer Schutz der Tiere; denn erst am 43., bzw. am 47. Tage setzt der katostrophale Gewichtssturz ein, der zum Tode führt, also doch ein gewisser Schutz durch den Saft, wenn auch die zweifellose Schädigung durch die Vorbehandlung sich in dem schlechten Gedeihen der Tiere dokumentiert (vgl. Wachstum von Diphtheriebacillen auf hydrolisiertem autoklaviertem Citronensaft in Mitteilung 1).

Über den Zusammenhang von Bestrahlung mit ultraviolettem Licht und Röntgenstrahlen und Veränderung des antiskorbutischen Faktors C im Citronensaft können wir uns kurz fassen. Wir selbst waren aus Tiermangel nicht in der Lage, uns ein eigenes Urteil darüber bilden zu können, glauben aber, daß der Einfluß von ultraviolettem Licht durch den Versuch von *Zilva*[1]) eindeutig entschieden ist: *Eine 8 stündige Höhensonnenbestrahlung schädigte den Saft so wenig, daß Meerschweinchen skorbutfrei blieben.*



M 11, M 12 Grundfutter + 5 ccm 4 Tg. b. Laboratoriumstemperatur gestandenen Citronensafts. Beide Tiere am 44. Tage an typischem Skorbut gestorben.

Kurve 5.

Ebenso müssen wir bei der Frage Citronensaft und Lüftung den Angaben Zilvas folgen. Durchleitung von O_2 durch den Citronensaft schädigt den Faktor C nur wenig, dagegen trat eine stärkere Schädigung auf, wenn gleichzeitig mit der Lüftung die Hitze auf den Saft einwirkte.

In diesem Zusammenhang ist noch kurz das „*Altern*" des Citronensaftes zu besprechen:

In der ersten Mitteilung wurde berichtet, daß saurer Citronensaft, 4 Tage in offener Schale auf den Brutschrank gestellt, in seiner Wirksamkeit auf das Bakterienwachstum nicht geschädigt ist. Füttert man Meerschweinchen mit einem solchen Saft, so gehen die Tiere an typischem Skorbut zugrunde. Über ähnliche Versuche berichtet *Gralka*[2]). *Durch das Stehen hat offenbar eine Umlagerung im Saft stattgefunden; auf jeden Fall ist der Prozeß des „Alterns" ein so eingreifender in das Gefüge eines an antiskorbutischen Substanzen so reichen Materials wie der Citronensaft, es darstellt, daß die Schädigung eine wesentliche größere ist, als wenn man z. B. selbst unter Zusatz mineralischer Säuren unter Druck erhitzt.* Auf diesen Versuch werden wir später noch einmal zurückkommen.

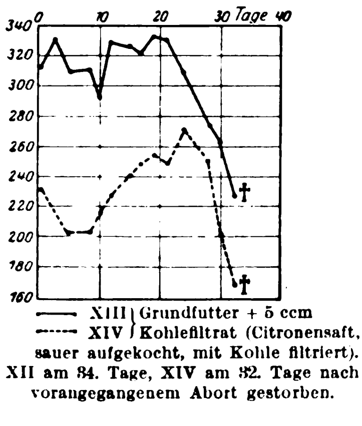
Durch Einwirken von Adsorbentien — Kaolin, Kohle, Talkum — (vgl. Mitteilung 1) konnten wir einen gewissen schädigenden Einfluß

[1]) Biochem. Journ. **13**, **64**. **1919**.
[2]) *Gralka*, zur Zeit im Druck.

auf das Bakterienwachstum erzielen. Wenn wir auch die fördernde Wirkung nicht völlig herausadsorbieren konnten, so war doch der Einfluß sicher. Wie verhält sich z. B. das Filtrat eines mit Kohle in der Hitze adsorbierten Saftes im Tierversuch? Kurve 6 gibt darüber Aufschluß:

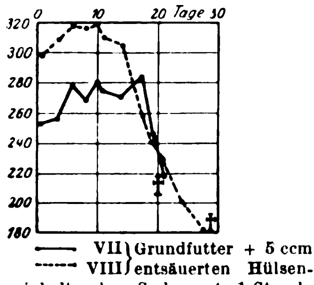
Den Meerschweinchen M 13 und M 14 wird zu ihrem Grundfutter 5 ccm Kohlefiltrat zugelegt. Tier 13 stirbt am 34. Tage; Tier 14 am 30. Tage an typischem Skorbut. Bei letzterem Tier muß man bemerken, daß der Tod vielleicht noch durch einen vorangegangenen Abort beschleunigt wurde.

Diese Versuche stehen in einem gewissen Gegensatz zu den Angaben der Literatur. *Harden* und *Zilva*[1]) und *Vedder*[2]) vertreten den Standpunkt, daß der Faktor C nicht durch Absorbentien zu beeinflussen ist,



—— XIII } Grundfutter + 5 ccm
------ XIV } Kohlefiltrat (Citronensaft, sauer aufgekocht, mit Kohle filtriert). XII am 34. Tage, XIV am 32. Tage nach vorangegangenem Abort gestorben.

Kurve 6.



—— VII } Grundfutter + 5 ccm
------ VIII } entsäuerten Hülseninhalts ohne Sodazusatz 1 Stunde bei 50—60° gehalten.
Am 24. bzw. 26. Tage an typischem Skorbut gestorben.

Kurve 7.

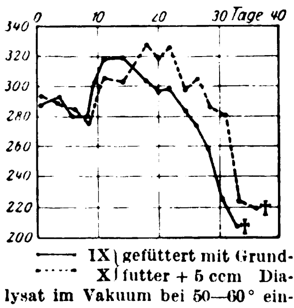
im Gegensatz zum antineuritischen Faktor B, während *Byfield*[3]) aus Orangensaft mit Kaolin das wirksame Prinzip adsorbiert. Bei in der Entwicklung nicht vorangegangenen Säuglingen sind 45 ccm Filtrates auf den Gewichtsanstieg unwirksamer als 15 ccm unfiltrierten Saftes. *Vielleicht wird man aus diesen Analogien zwischen wachstumfördernder Wirkung des unfiltrierten Saftes beim Säugling und Wachstum der Bakterien gewisse Schlüsse auf das Vorhandensein eines wachstumfördernden Faktors ziehen können, der in der Citrone neben dem antiskorbutischen existiert.* Näheres darüber wollen wir in den Schlußsätzen dieser Arbeit ausführen.

Um eine Parallele zwischen dem Einfluß der *Dialyse* auf das Wachstum der Bakterien und Skorbuterkrankungen des Meerschweinchens zu ziehen, fütterten wir (vgl. Kurven 7 und 8) je zwei Tiere M 7, M 8 und M 9, M 10 mit je 5 ccm Hülseninhalt bzw. Dialysats.

---

[1]) Biochem. Journ. **12**, 93. 1918.
[2]) Mil. surg. **29**, 2, 133. 1921.
[3]) Americ. Journ. of dis. of childr. **19**, 5, 349. 1920.

Wir gingen dabei so vor, daß wir den Säuregehalt des Hülseninhaltes als Maßstab für den Grad der Dialyse ansahen, d. h. wir nahmen an, daß die dialysablen, i. e. die krystalloiden Substanzen in dem Augenblick durchdialysiert sind, wenn die Säure aus der Hülse heraus ist. Dieses dauert durchschnittlich 3—4 Tage, gleichgültig ob wir die Hülse bei Zimmertemperatur stehen ließen oder den Vorgang durch Schütteln im Schüttelapparat zu beschleunigen suchten. Im letzteren Fall waren nach ca. $1^1/_2$ Tagen in 1 ccm Citronensaft des Hülseninhaltes so viel Säure, wie 1 ccm $^n/_{10}$-NaOH entsprach. Nach 3 Tagen war die Entsäuerung soweit gediehen, daß 1 ccm Saft nur noch 0,2 ccm $^n/_{10}$-NaOH beanspruchte. (Wenn man in die Hülse ursprünglich 10 ccm eingefüllt hätte, mußte man infolge des Flüssigkeitsaustausches von der umgebenden Flüssigkeit der Hülse und der Hülse selbst mit einer gewissen Verdünnung rechnen, so daß den ursprünglichen 10 ccm Citronensaftes am letzten Tage des Entsäuerungsprozesses ca. 13 ccm Hülseninhalt entsprachen.) Da die umgebende Flüssigkeit der Hülse jeden Tag nach Möglichkeit gewechselt wurde, um das Gefälle für den Entsäuerungsprozeß zu beschleunigen, war am Ende des Vorgangs die Menge des Dialysates relativ groß und verdünnt und wurde vor Beginn des Versuchs im Vakuum bei höchstens 40° eingeengt und nachher mit Soda alkalisiert. Um den durch diesen Einengungsprozeß eventuell entstehenden Versuchsfehler auszuschalten — er kann nicht groß sein, weil die Temperatur relativ niedrig ist —, wurde auch der entsäuerte Hülseninhalt nach Beendigung der Dialyse für die Dauer des Einengens im Vakuum im Wasserbad bei 40° gehalten, so daß für Dialysat und Hülseninhalt in bezug auf die Temperatur die gleichen Voraussetzungen gegeben waren.



—— IX⎱ gefüttert mit Grund-
······ X⎰ futter + 5 ccm Dialysat im Vakuum bei 50—60° eingeengt, mit Soda alkalisiert. IX am 37. Tage, X am 40. Tage an typischem Skorbut gestorben.

Kurve 8.

Sehen wir uns die Kurven 7 und 8 an: M 7 und M 8 bekommen zu dem üblichen Grundfutter entsäuerten Hülseninhalt, der in der oben besprochenen Weise vorbereitet war. Am 24. und 26. Tage des Versuchs sind beide Tiere an typischem Skorbut gestorben, d. h. etwa nach der gleichen Zeit, wie nur die Kontrolltiere in Kurve 1, die ohne jeden Citronensaft gefüttert waren. Der Hülseninhalt ist also nach 3tägiger Dialyse völlig des antiskorbutischen Faktors C bar. Kurve 8 zeigt das Verhalten von M 9 und M 10, die mit 5 ccm Dialysat gefüttert wurden. Hier sieht die Kurve besser aus. Zunächst der übliche Gewichtsanstieg wie beim gesunden Tier und dann, etwas protahiert, der Gewichtssturz, der am 37. bzw. am 40. Tage zum Tode führt. Bei der Sektion findet sich bei beiden Tieren ein typischer Skorbut.

Vergleichen wir die beiden Kurven untereinander, so können wir das eine hervorheben, daß nach anfänglichem Gewichtsanstieg auf Kurve VII der Tod der Tiere hier etwas länger hat auf sich warten lassen. Soll man bei diesem geringen zeitlichen Unterschied von einem relativen Skorbutschutz sprechen? Wir möchten die Frage verneinen. Denn ergänzend zu diesen Tierversuchen hatten wir Gelegenheit, bei einem typischen barlowkranken Kinde die Wirksamkeit des Hülseninhaltes zu erproben.

Kind H. D., 8 Monate alt, wird mit typischer Barlowanamnese (einseitige Überfütterung mit Milch und Mehl) eingeliefert. Der Mutter fiel auf, daß das Kind seit 14 Tagen geschwollene Beine hatte, beim Anfassen laut schrie und die Nahrungsaufnahme verweigerte. Bei dem Pat. fanden sich neben sehr ausgedehnten Zahnfleischblutungen Hautblutungen und starke Schwellung und Schmerzempfindlichkeit beider Unterschenkel, besonders in der Kniegegend, mit Bevorzugung der linken Seite. Im Urin sind reichlich Erythrocyten.

Diagnose: *Möller-Barlow*sche Krankheit.

Diesem Kinde gaben wir zu der gleichen Kost, die es zu Hause erhalten hatte, täglich 25 ccm Citronensaft-Hülseninhalt. Unter dem Einfluß dieses therapeutischen Regims trat ein Rückgang der Knochenerscheinungen und Zahnfleischblutungen ein. Das Kind fing an, sich wieder spontan zu bewegen, und wurde im Gegensatz zu der schlechten Stimmung bei der Aufnahme zusehends vergnügter. Am 14. Tage erfolgte ein plötzlicher Stimmungsumschwung, am 16. Tage traten von neuem Zahnfleischblutungen und Schwellungen der Unterschenkel auf, kurz, ein Rezidiv des offenbar nicht optimal behandelten Barlow. Nach Zugaben von originärem Citronensaft heilten alle Erscheinungen restlos ab. Interessanterweise war auch die Verschlechterung des Befindens in einer biologischen Blutreaktion zum Ausdruck gekommen: das Serum des Kindes, das in der Rekonvaleszenz imstande war, trypanosomeninfizierte Mäuse vor der septischen Erkrankung zu schützen, hatte diese Eigenschaft wieder verloren [Näheres darüber in einer gemeinsamen Mitteilung[1])].

Dieser Versuch am Menschen zeigt uns, daß noch geringe Mengen wirksamer Substanz im Hülseninhalt vorhanden war, die zwar zu einer vorübergehenden Besserung, nicht aber zur völligen Heilung ausreichten. Einschränkend muß man allerdings bei diesen Versuchen hinzufügen, daß Vergleiche deshalb nur mit allergrößter Reserve anzustellen sind, weil, wie Kurve V uns gezeigt hat, Citronensaft schon durch Stehen bei Zimmertemperatur den wirksamen antiskorbutischen Faktor C einbüßt, so daß die Dialyse erst dann einen Einblick in die kolloid-chemischen Verhältnisse des Saftes geben kann, wenn es technisch gelingen sollte, sie schneller durchzuführen.

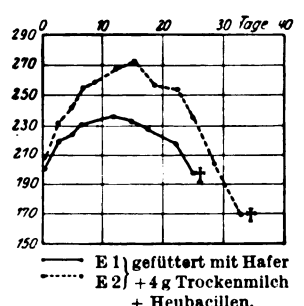
In weiteren Versuchen wollten wir durch *Ultrafiltration* zu einem Resultat in unserer Fragestellung kommen. Wir filtrierten Citronensaft durch Berkefeldfilter und fütterten Meerschweinchen C 1 und C 2 mit filtriertem Saft, Meerschweinchen D 1 und D 2 mit Citronenrückstand. Leider funktionierten unsere Filter so schlecht, daß die Versuche nicht eindeutig ausfielen, infolgedessen vorzeitig unterbrochen werden mußten. Wir behalten uns vor, später noch einmal darauf zurückzukommen.

Zum Schluß weisen wir noch kurz auf Versuche hin, die vielleicht einmal interessante Einblicke in die Synthese akzessorischer Nährstofffaktoren gewähren können. Wir besprechen sie ausführlicher an anderer

[1]) *Leichtentritt* und *Zielaskowski*, Jahrb. f. Kinderheilk. 1922, Juniheft.

Stelle[1]). Erwähnt seien Fütterungsversuche mit Bakterien, bei denen wir feststellen wollten, wieweit ihr Zusatz zur Grundnahrung skorbutverhütend wirkt.

Kurve 9 zeigt, daß der Zusatz von 1—2 g Heubacillen die Tiere E 1 und E 2 vor Skorbut nicht bewahrte. Vielleicht war die verabreichte Menge zu klein. *S. R. Damon*[2]) führte ähnliche Versuche mit gleichem Erfolg aus.



E 1 tot am 27. Tag, E 2 am 38. Tag an typischem Skorbut gestorben.

Kurve 9.

Ultrafiltrationsversuche mußten aus dem oben angeführten Grunde aufgegeben werden.

Überblicken wir die Resultate der Tierversuche, so ergibt sich, daß sämtliche Änderungen, die mit der Konstitution des Citronensaftes vorgenommen werden, schädigend auf das Meerschweinchen wirken und Skorbut hervorrufen. Vielleicht läßt sich in der Quantität der Schädigung ein Unterschied bemerken. Alle Prozesse, die das Gefüge des Citronensaftes durch Hitze erschüttern, schädigen seine antiskorbutische Wirksamkeit selbst in bezug auf den Meerschweinchenorganismus relativ wenig. Das gleiche Resultat wird durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht erzielt; dagegen stellt das einfache Stehen bei Zimmertemperatur einen auffallenden Denaturierungsprozeß dar. Wenn wir alle diese Befunde mit denen vergleichen, die wir in unserer ersten Mitteilung über den Einfluß der verschiedensten Prozeduren auf die bakterienwachstumfördernden Faktoren gewonnen haben, so ergeben sich beträchtliche Unterschiede.

Die Tabelle bringt die Resultate übersichtlich dargestellt, ergänzt durch einige wenige aus der Literatur.

Citronensaft wurde verändert durch	und wirkte im		
	Bakterienversuch	Meerschweinchenvers.	beim Barlowkranken
Hitze (z. T. im Autoklaven)	+	nicht prompt. schließl. -	+
Ultraviolettes Licht	+	+ (Zilva)	
Röntgenbestrahlung	+		
Lüftung	+	+ (Zilva)	
Lüftung und Hitze	+	+	
Adsorption	+ b. nichtgedeihendem Säugl. +	—	
Dialyse { Dialysat	+ 50% der Wirkung geht verloren	—	vorübergehend +
Dialyse { Hülseninhalt	+	—	
Stehenlassen „Altern"	+	—	

[1]) *Leichtentritt* und *Zielaskowski*, zur Zeit im Druck.
[2]) Journ. of biochem. **48 II**, 379. 1921.

Bei den Bakterienversuchen ergibt sich als Resultat, daß die Bakterien (Diphtherie) im großen ganzen auf dem Citronenagar wachsen, gleichgültig wie die Vorbehandlung des Saftes war, nur die Adsorption und Dialyse sind von Einfluß auf seine Wirksamkeit. Der Teil der Tabelle, der sich auf den antiskorbutischen Faktor C im Tierversuch bezieht, zeigt beträchtliche Schwankungen, da sämtliche Versuchstiere skorbutisch werden, mit Ausnahme derjenigen, die Citrone erhielten, die ultraviolettem Licht bzw. der Lüftung ausgsetzt wurde. Und gerade bei diesen Tieren handelte es sich um Versuche, die nicht von uns persönlich angestellt wurden, eine Lücke, die noch auszufüllen bleibt. *Außerdem ist die Erhitzung für das Meerschweinchen nur von relativem Schaden (eine schöne Ergänzung bietet das Barlowkind, das mit erhitztem Citronensaft gesund wird).* Wieder ein Beweis mehr, ein wie feines Reagens der Meerschweinchenversuch darstellt. Vielleicht bieten die Adsörptionsversuche einen Anhaltspunkt für ein Weiterkommen. *Der bakterienwachstumfördernde Faktor wird nur zum Teil adsorbiert, im Gegensatz zum antiskorbutischen.*

Andererseits ist es beachtenswert, daß man mit Citronensaft bei Kindern, die quantitativ und qualitativ ausreichend ernährt wurden und dabei im Gewicht stehen blieben, neue Zunahmen erzielte [*Aron-Bessau*[1]), *Aron-Samelson*[2]), *Byfield*], die ausblieben, wenn der Saft — wie oben erwähnt — durch Kaolin adsorbiert wurde (*Byfield*). Zwischen dem Wachstum der Bakterien und dem Anwuchs der nicht gedeihenden Kinder drängen sich gewisse Parallelen auf. Man könnte sich vorstellen, daß, wie z. B. der Saft des Pankreas, neben dem Trypsin noch das Steapsin als Ferment enthält, auch *der Citronensaft mehrere solcher „Fermente" besäße, die durch ihre verschiedene Wirksamkeit sich auch als 2 verschiedene Stoffe erweisen. Man kann also sagen: Der Citronensaft enthält*

1. *den antiskorbutischen Faktor C und*

2. *einen wachstumfördernden Faktor, der wirksam ist bei nicht gedeihenden Kindern und gewissen Arten von Bakterien. Für den letzteren Faktor könnte man unter Umständen die Bezeichnung Vitamin D einführen,* wie dies neuerdings *Funk* tut und wie dies *Aron*, wenn auch mit etwas anderer Nomenklatur, früher bereits durchgeführt[3]) hat.

Man muß sich allerdings dabei klar darüber sein, ob dieser neue Faktor D nicht evtl. identisch ist mit dem Faktor B, wofür manches zu sprechen scheint (*Byfield*). Deshalb wird unser nächstes Ziel sein müssen, nachzuprüfen, wieweit der Faktor B imstande ist, das Wachstum der Bakterien zu fördern.

---

[1]) Nach bisher unveröffentlichten Versuchen.

[2]) Dtsch. med. Wochenschr. 1920, 28.

[3]) Berl. klin. Wochenschr. 1920, 773.

Versuche darüber in anderer Richtung liegen bereits von *E. Fraenkel* und *Erich Schwarz*[1]), *Abderhalden* und *Köhler*[2]), *Euler* und *Petersson*[3]), *Williams*[4]), *Swoboda*[5]) u. a. m. vor. Diese fanden, daß Hefe und Hefeextrakte nicht nur imstande wären, die alimentäre Dystrophie der Vögel zu heilen, sondern auch die Gärung der verschiedensten Zuckerarten und des brenztraubensaueren Kaliums zu beschleunigen. Auch der Zusatz von Hefeextrakten zu Hefezellen war imstande, eine starke Vermehrung der Hefezellen zu erzielen. Die Amerikaner haben bereits quantitative Methoden ausgearbeitet, um in der Vermehrung der Hefezellen einen Gradmesser für den Gehalt der verschiedensten Stoffe an „Vitaminen" zu gewinnen.

[1]) Diese Zeitschr. **112**, 203. 1920.
[2]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **176**, 209. 1919.
[3]) Arch. f. physiol. Chem. **114**, 4. 1921.
[4]) Zit. nach *Abderhalden*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **176**, 209. 1919.
[5]) Journ. of biochem. **44**, 2, 531. 1920.

Amboceptoren und Receptoren[1]).

II. Mitteilung.

Von

J. Morgenroth und **R. Bieling.**

(Eingegangen am 2. Mai 1922.)

Die zahlreichen Untersuchungen, welche sich an die *Forssman*sche[2]) Entdeckung der heterologen Hämolysine anschlossen [*Orudschiew*[3]), *Friedberger* und *Schiff*[4]), *Doerr* und *Pick*[5]), *Morgenroth* und *Bieling* (l. c.) u. a.], haben eine Reihe von Antigenverwandtschaften innerhalb des Tierreiches aufgedeckt, andererseits aber auch gezeigt, daß verschiedene Zellen derselben Tierart in ihrem antigenen Verhalten völlig verschieden sein können. Insbesondere war die wesentliche Differenz zwischen Blutkörperchen und den übrigen Organzellen bemerkenswert. Aber auch unter den verschiedenen Organzellen selbst bzw. Organ- und Tumorzellen derselben Tierart bestehen — wenn auch lange nicht so tiefgehende — Unterschiede. Diese machen sich in einer besonders ausgeprägten Avidität der Sera zu den entsprechenden Antigenen geltend, wie an dem Beispiel der Mäusenieren- und der Mäusecarcinom-Sera im Bindungs- und Transgressionsversuch gezeigt werden konnte.

Im folgenden soll nun in zusammengefaßter Form über Versuche berichtet werden, welche im Anschluß an die früher mitgeteilten unternommen wurden, um weitere Einsicht in das verwickelte und schwer übersichtliche Gebiet der Receptorenverwandtschaften und Receptorendifferenzen zu gewinnen.

Dabei kam es im wesentlichen darauf an, eine Aufspaltung und Charakterisierung der zahlreichen verschiedenen Antigenfunktionen der Ziegenblutkörperchen im Vergleich mit einer umschriebenen Anzahl andersartiger Organzellen und Blutkörperchen vorzunehmen, wobei

---

[1]) I. Mitt. s. diese Zeitschr. **68**, 85. 1915. Die Versuche wurden 1913 in der Bakteriologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin ausgeführt.

[2]) Diese Zeitschr. **37**, 78. 1911.

[3]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **16**, 268. 1913.

[4]) Berl. klin. Wochenschr. **50**, 1557 u. 2328. 1913.

[5]) Diese Zeitschr. **50**, 129. 1913.

sich die Vorstellung, daß eine Zelle verschiedene Teilreceptoren nebeneinander besitzen kann, heuristisch besonders bewährte. Auf die zahlreichen Befunde von anderer Seite auf dem weitverzweigten Gebiet soll bei der Darstellung nur insoweit eingegangen werden, als sie den mitgeteilten Untersuchungen als Grundlage dienen oder aber mit ihren Ergebnissen in Widerspruch stehen.

Der Ausgangspunkt für die Untersuchungen war die Tatsache, daß Organzellen einer ganzen Anzahl verschiedener Tierarten (Meerschweinchen, Pferd, Hund, Katze, Maus, Huhn, Schildkröte) mit dem Ziegenblut die Eigenschaft teilen, beim Kaninchen Ziegenbluthämolyse hervorzurufen[1]), daß also in der Nomenklatur der Seitenkettentheorie die Organzellen der genannten Tierarten und die Ziegenblutkörperchen gleichsinnig wirkende Receptoren besitzen. Es ergab sich nun die Frage, ob diese verschiedenen Receptoren untereinander identisch seien oder nicht, d. h. also, ob die Organzellen und die Ziegenblutkörperchen verschiedenartige oder gleichartige Ziegenhämolysine hervorbringen.

Den ersten Aufschluß bot hier der Bindungsversuch. Dieser ergab, daß Meerschweinchen- und Mäuseorgane als Vertreter der obgenannten Zellarten, ebenso wie Ziegenblut die Ziegenhämolysine des Meerschweinchen-Nieren-Kaninchen-Serums (M-N-K-S) und des Mäuse-Tumor-Kaninchen-Serums (Ms-T-K-S) binden können, daß also die sämtlichen Zellarten über gleichartige Receptoren verfügen müssen.

Tabelle I.

Vergleichende Bindung von Meerschweinchennieren-Kaninchenserum mit Meerschweinchennieren und Ziegenblut.

A. 5 proz. Aufschwemmung von Meerschweinchennierenzellen (Technik siehe I. Mitteilung).

B. 5 proz. Aufschwemmung von Ziegenblutkörperchen. Je 0,5 ccm von A und B werden mit steigenden Mengen des inaktivierten Meerschweinchen-Nieren-Kaninchenserums versetzt (Titer: 1 AE. = 0,002 ccm). Volumen 1,0 ccm, 1 Stunde 37°; zentrifugiert; der klare oder leicht opalescente Abguß wird nach Zusatz von 0,05 ccm frischen Meerschweinchenserums auf sein hämolytisches Vermögen gegenüber 0,5 ccm 5 proz. Ziegenbluts geprüft. Das Resultat bringt folgende Tabelle:

Serummenge	A. Abguß von Meerschweinchenniere	B. Ziegenblut
0,1 ccm $^1/_{10}$ = 5 AE.	0	0
0,5 „ = 25 „	sw	sw
0,1 „ $^1/_1$ = 50 „	m	m—st
0,2 „ = 100 „	c	c
0,3 „ = 150 „	c	c

[1]) Dabei wird im folgenden Ziegenblut und Hammelblut gleichgesetzt werden, ohne daß damit allerdings etwas über die feineren Unterschiede präjudiziert werden soll.

0,5 ccm der 5 proz. Meerschweinchennierenaufschwemmung und 0,5 ccm der 5 proz. Ziegenblutaufschwemmung haben aus dem Meerschweinchennieren-Kaninchenserum 50 AE. fast völlig gebunden.

Das mit Mäusetumorserum vorbehandelte Ziegenblut hat sein Bindungsvermögen gegenüber dem nicht vorbehandelten von 50 auf 30 AE. vermindert.

Tabelle II.

Bindung von Meerschweinchennieren-Kaninchenserum mit Mäuseniere und Mäusetumor.

In der früher eingehend geschilderten Weise werden 5 proz. Zellsuspensionen von Mäuseniere und Mäusetumor hergestellt. Je 0,5 ccm 5 proz. Aufschwemmung von A. Mäuseniere, B. Mäusetumor versetzt mit steigenden Mengen Meerschweinchennierenserum (AE. = 0,002 ccm), 1 Stunde 37°, dann zentrifugiert. Der opalescente Abguß wird mit 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut und 0,05 ccm frischen Meerschweinchenserums geprüft.

	A.	B.
	Abguß von	
Menge des Serums	Mäuseniere	Mäusetumor
0,1 ccm $^1/_{10}$ = 5 AE.	sw	sw
0,5 „ $^1/_{10}$ = 25 „	c	c
0,1 „ $^1/_1$ = 50 „	c	c

0,5 ccm 5 proz. Aufschwemmung von Mäuseniere und Mäusetumor haben also beide etwa 5 AE. der ziegenhämolytischen Amboceptoren des Meerschweinchennieren-Kaninchenserums gebunden.

Tabelle III.

Bindung von Mäusetumor-Kaninchenserum mit Meerschweinchennieren.

0,8 ccm einer 5 proz. Meerschweinchennierenaufschwemmung versetzt mit 0,2 ccm Mäusetumor-Kaninchenserum; 1 Stunde 37°; dann zentrifugiert. Der Abguß stellt eine fast 10fache Serumverdünnung dar. Er wurde gleichzeitig mit nicht vorbehandeltem Serum gegen 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut bei Zusatz von 0,05 ccm Meerschweinchenserum eingestellt.

Das Resultat ergibt folgende Tabelle, in der, wie erläutert, die Zahlen für die Abgußmengen der 10fachen Verdünnung des nicht vorbehandelten Serums entsprechen.

Serum nicht vorbehandelt		Serum mit Meerschweinchenniere vorbehandelt	
Serummenge		Abgußmenge	
1,0 $^1/_{1000}$	c	1,0 $^1/_{100}$ . .	c
0,75 $^1/_{1000}$ . . .	c	0,75 $^1/_{100}$ . .	c
0,5 $^1/_{1000}$	c	0,5 $^1/_{100}$ . .	wc
0,25 $^1/_{1000}$ . . .	c	0,25 $^1/_{100}$ . .	fc
1,0 $^1/_{10000}$	st		
0.	w		

Der hämolytische Titer des Tumorserums hat nur wenig abgenommen. Meerschweinchenniere hat nur wenige der Amboceptoren des Mäusetumor-Kaninchenserums gebunden.

Ziegenblut bindet also ebenso wie Mäusenieren die Ziegenhämolysine des M-N-K-S. Mäusenieren und Mäusetumor binden ebenfalls die Ziegenbluthämolysine aus M-N-K-S. Andererseits bindet Meerschweinchenniere die Ziegenbluthämolysine aus Ms-T-K-S.

Diese Versuche zeigen, daß Ziegenblut, Meerschweinchenorgane und Mäuseorgane gemeinsame Receptoren besitzen: denn nicht nur rufen sie im Kaninchen die Bildung von Ziegenhämolysinen hervor, sondern sie binden auch die Ziegenhämolysine, einerlei, mit welchem der verschiedenen Antigene sie erzeugt worden sind. Auffallend aber ist dabei, daß die Antigene aus den heterologen Hämolysinen viel weniger Amboceptoreinheiten (AE.) binden als aus homologen Hämolysinen. Zum Beispiel fixieren Mäusenieren und Mäusetumor aus einem M-N-K-S 5—10 AE., während im gleichzeitigen Versuch Meerschweinchenniere 50 AE. herausnimmt. Umgekehrt bindet Mäusetumor aus Ms-T-K-S $^{19}/_{20}$ des Amboceptors.

Es wäre nun möglich, daß durchgängig das zur Immunisierung benutzte Antigen eine stärkere Avidität zu seinen zugehörigen Ziegenhämolysinen besäße als zu einem mit anderen Zellen hervorgerufenen. Dann müßten durch Bindung mit dem Immunisierungsantigen stets zahlreiche, durch Bindung mit einem anderen Antigen dagegen stets wenige AE. festgehalten werden.

An dem folgenden Beispiel kann jedoch gezeigt werden, daß dies keineswegs die Regel ist.

Immunisiert man Kaninchen mit Hundemilz (2 mal 0,9 ccm einer 10 proz. Aufschwemmung intravenös), so erhält man Ziegenbluthämolysine vom Titer 0,0005—0,0002 für 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut. Mäusetumor bindet nun aus einem solchen Hundemilzserum ebenso wie aus einem Mäusetumorserum eine sehr große Menge von AE. (gegen 50) und ebenso bindet Hundemilz aus einem Mäusetumorserum mehr als 50 AE., während, wie oben gezeigt, Meerschweinchenorgane nur etwa 5 AE. festhalten können.

Tabelle IV.

A. Bindung von Hundemilz-Kaninchenserum durch Mäusetumor.

Steigende Mengen eines Hundemilzserums (AE. = 0,0002 ccm) werden mit je 0,5 ccm 5 proz. Mäusetumoraufschwemmung 1 Stunde im Brutschrank gehalten, zentrifugiert und der Abguß gegen 0,5 proz. Ziegenblut unter Zusatz von 0,05 ccm Meerschweinchenserum geprüft.

Serummenge	Hämolyse des Abgusses
0,5 $^{1}/_{100}$ = 25 AE.	m—st
1,0 $^{1}/_{100}$ = 50 AE.	c
0,15 $^{1}/_{10}$ = 75 AE.	c
0,2 $^{1}/_{10}$ = 100 AE.	c

0,5 ccm 5 proz. Mäusetumorsuspension hat also über 25 AE. des Hundemilzserums gebunden.

B. Bindung von Mäusetumor-Kaninchenserum durch Hundemilz.

Steigende Mengen eines Mäusetumor-Kaninchenserums (AE. = 0,0003 ccm) werden mit je 0,5 ccm einer 5 proz. Hundemilzsuspension 1 Stunde im Brutschrank gehalten, zentrifugiert und der Abguß gegen 0,5 ccm 5 proz. Ziegenbluts unter Zusatz von 0,05 ccm Meerschweinchenserum geprüft.

Serummenge	Hämolyse des Abgusses
0,6 $^1/_{1000}$ = 2 AE.	Sp
0,3 $^1/_{100}$ = 10 AE..	Sp
0,75 $^1/_{100}$ = 25 AE.	w
0,15 $^1/_{10}$ = 50 AE..	w—m

Hundemilz hat also die Amboceptoren des Tumorserums sehr stark gebunden.

Dieses Verhalten macht es unmöglich, eine besonders starke Avidität des zur Immunisierung benutzten Antigens allein zur Erklärung der geschilderten Unterschiede im Meerschweinchen- und Mäuseorgan im gleichartigen und gekreuzten Bindungsversuch heranzuziehen. Es besteht vielmehr nur die Möglichkeit, partielle Receptorengemeinschaften und Unterschiede für diese Differenzen verantwortlich zu machen, wie solche seit den Befunden von *Ehrlich* und *Morgenroth*, daß Kaninchen nach Immunisierung mit Ziegenblut auch Ochsenhämolysine bilden, bekannt waren.

Es wird also anzunehmen sein, daß immer nur ein Teil der Ziegenblutreceptoren von Ziegenblutkörperchen und Organzellen anderer Tiere identisch sind. Gesichert wird dieser Schluß durch die Tatsache, daß bei der Behandlung von Meerschweinchen mit Ziegenblut auch im Meerschweinchenorganismus Ziegenbluthämolysine entstehen. Umgekehrt erhält man weder durch die Behandlung mit Meerschweinchenorganen (*Orudschiew*) noch auch mit Mäusenieren oder Mäusetumor irgendwelche Ziegenhämolysine.

Tabelle V.

Immunisierung von Meerschweinchen mit Mäuseorganen.

2 Meerschweinchen, $^1/_2$—$^3/_4$ kg Gewicht, erhielten 2 mal mit 9 Tagen Zwischenraum eine Injektion von je 2,5 ccm einer 20 proz. Aufschwemmung von Mäusenieren intraperitoneal.

2 andere Meerschweinchen werden analog mit 2 mal 2,0—2,5 ccm einer 40 proz. Mäuseleberaufschwemmung intraperitoneal behandelt. Das Serum sämtlicher Tiere löste darauf in der Menge von 0,25 ccm 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut entweder überhaupt nicht oder nur spurenweise. Nicht gelöst werden weiterhin Menschen-, Pferde-, Rinder-, Hunde-, Katzen-, Ratten-, Mäuse- und Hühnerblut.

Das Ziegenblut enthält also außer den im Meerschweinchen unwirksamen Ziegenblutreceptoren der Meerschweinchen- und Mäuseorgane noch eine weitere Gruppe von Receptoren, welche im Meerschweinchen und in der Maus nicht vorhanden sind und welche ebenfalls beim Kaninchen und beim Meerschweinchen Ziegenbluthämolysine hervorrufen.

Diese nur dem Ziegenblut, nicht aber dem Meerschweinchen und den Mäuseorganen gemeinsame Gruppe von Receptoren soll mit A bezeichnet werden. Da sie im Kaninchen zur Antikörperbildung führt, so muß geschlossen werden, daß sie auch im Kaninchen fehlt.

Daneben muß aber das Ziegenblut noch eine weitere Receptorengruppe B besitzen, welche es mit Meerschweinchen- und Mäuseorganen gemeinsam hat. Diese partielle Receptorendifferenz erklärt es, daß ein Antigen aus dem mit ihm selbst erzeugten Hämolysin mehr AE. binden kann als aus einem Hämolysin, das mit einem anderen Antigen hervorgerufen wird.

Ganz in demselben Sinne sprechen die Versuchsergebnisse mit dem Ziegenblut-Meerschweinchen-Serum (Z-M-S), das nach den obigen Ausführungen nur Antikörper gegen die dem Ziegenblut spezifische A-Gruppe enthalten darf, nicht aber gegen die Meerschweinchenreceptorengruppe B. Die Ziegenhämolysine des Z-M-S werden zwar von Ziegenblut, nicht aber von Meerschweinchen- oder Mäuseorganen gebunden, welche ja nur die B-Receptoren besitzen.

Tabelle VI.

Immunisierung von Meerschweinchen mit Ziegenblut.

14 Meerschweinchen wurden 2 mal in einem Intervall von 7 Tagen mit je 5,0—6,0 ccm gewaschenem Ziegenblut intraperitoneal injiziert und nach weiteren 7 Tagen entblutet.

Titer für 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut 0,001—0,0001 ccm
„ „ 0,5 „ 5 „ Rinderblut 0,01 —0,005 „

Nicht gelöst wird Menschen- und Kaninchenblut.

Tabelle VII.

Bindung von Ziegen-Meerschweinchenserum mit Ziegenblut.

Steigende Mengen Ziegen-Meerschweinchenserums (AE. = 0,0015 ccm, für 1 0 ccm 5 proz. Ziegenblut) werden mit je 1,0 ccm 5 proz. Ziegenblut im Volumen 2,0 ccm 50 Minuten bei 40° gehalten, zentrifugiert und der Abguß mit 1,0 ccm 5 proz. Ziegenblut und 0,1 ccm Meerschweinchenserum geprüft.

Serummenge	Lösung des Abgusses
0,125 $^1/_{100}$ = fast 1 AE.	Spchen
0,19 $^1/_{100}$ = gut 1 AE.	Sp
0,25 $^1/_{100}$ = $1^3/_4$ AE.	w
0,5 $^1/_{100}$ = $3^1/_4$ AE.	m
0,75 $^1/_{100}$ = 5 AE.	fc
0,125 $^1/_0$ = $8^1/_3$ AE.	c
0,2 $^1/_0$ = $3^1/_3$ AE.	c

Ziegenblut hat also ca. 4 lösende Dosen des untersuchten Ziegen-Meerschweinchenserums festgehalten.

Gleichzeitig wurde ein Parallelversuch mit einem Ziegen-Kaninchenserum gemacht. Obwohl dessen hämolytischer Titer nur 0,008 ccm für 1,0 ccm 5 proz.

Ziegenblut betrug, es also mehr als 5 mal so schwach wie das Ziegen-Meerschweinchenserum war, so banden doch 1,0 ccm 5 proz. Ziegenblut von ihm über 80 AE. Die Grenzdosis wurde nicht bestimmt.

Tabelle VIII.

Bindung von Ziegen-Meerschweinchenserum mit Mäuseniere, Mäusetumor, Meerschweinchenniere und Ziegenblut.

Je 0,5 ccm von 5 proz. Aufschwemmung von Mäuseniere, Mäusetumor und Meerschweinchenniere, sowie je 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblutaufschwemmung werden mit steigenden Dosen Ziegen-Meerschweinchenserum vom Titer AE. = 0,002 ccm 1 Stunde im Volumen 1,7 ccm im Brutschrank gehalten. Dann wird zentrifugiert und der Abguß gegen 0,5 ccm Ziegenblut unter Zusatz von 0,05 ccm Meerschweinchenserum geprüft mit folgendem Resultat:

Zugesetzte Menge des Z-M-S	Mäuseniere	Mäusetumor	Meerschweinchenniere	Ziegenblut
0,2 $^1/_{100}$ = 1 AE. . . .	fc	fc	c	w
0,4 $^1/_{100}$ = 2 „ . . .	c	c	c	m
0,6 $^1/_{100}$ = 3 „ . . .	c	c	c	st
0,8 $^1/_{100}$ = 4 „ . . .	c	c	—	c
1,0 $^1/_{100}$ = 5 „ . . .	c	c	—	c
1,2 $^1/_{100}$ = 6 „ . . .	c	c	—	c

Meerschweinchenniere hat also, in Übereinstimmung mit den Resultaten von *Weil* und *Schiff*, aus dem Ziegen-Meerschweinchenserum keine ziegenhämolytischen Amboceptoren gebunden.

Die minimale Abschwächung, welche 1 AE. durch die Vorbehandlung mit Mäuseniere und Mäusetumor erlitt, dürfte als innerhalb der Fehlergrenzen liegende, unspezifische Hemmung anzusehen sein.

Dagegen hat Ziegenblut, wie in den früheren Versuchen, 3 AE. gebunden.

Weiterhin aber bindet Ziegenblut, das mit einem Überschuß von Z-M-S vorbehandelt ist, in dem also die A-Receptoren verstopft sind, genau soviel AE. aus einem Mäuseorgan-Kaninchenserum wie unbehandeltes Ziegenblut. Die Vorbehandlung mit Z-M-S hat also die B-Receptoren des Ziegenblutes unbeeinflußt gelassen.

Tabelle IX.

A. Bindung von Mäusetumor-Kaninchenserum mit Ziegenblut.

1,0 ccm 5 proz. Ziegenblut wird mit steigenden Mengen Mäusetumor-Kaninchenserums (Titer AE. = 0,00075) versetzt und gebunden wie oben.

B. Verstopfung von Ziegenblut mit Ziegen-Meerschweinchenserum für Mäusetumor-Kaninchenserum.

Zu 5 Röhrchen mit je 1,0 ccm 5 proz. Ziegenblut je 0,015 ccm Ziegen-Meerschweinchenserum, also je 10 AE., zugesetzt, nach 1 Stunde Bindung im Brutschrank, abzentrifugiert und der Bodensatz mit 1,0 ccm Kochsalzlösung aufgeschüttelt. Mit diesem vorbehandelten Blut wird dann ein dem vorigen analoger Bindungsversuch mit Mäusetumor-Kaninchenserum angesetzt.

A. Natives Ziegenblut Zugesetzte Serummenge	Hämolyse d. Abgusses	B. Mit Z-M-S vorbehandeltes Ziegenblut Zugesetzte Serummenge	Hämolyse d. Abgusses
0,45 $^1/_{10}$ = 30 AE.	w	0,60 $^1/_{10}$ = 40 AE.	m—w
0,60 $^1/_{10}$ = 40 „	st—m	0,68 $^1/_{10}$ = 45 „	sst
0,75 $^1/_{10}$ = 50 „	fc	0,75 $^1/_{10}$ = 50 „	c
0,81 $^1/_{10}$ = 54 „	c	0,83 $^1/_{10}$ = 55i „	c
0,84 $^1/_{10}$ = 56 „	c	0,90 $^1/_{10}$ = 60 „	c
0,90 $^1/_{10}$ = 60 „	c		

Durch die Vorbehandlung des Ziegenblutes mit Ziegen-Meerschweinchenserum ist also keine deutliche Veränderung seines Bindungsvermögens für Tumorserum eingetreten.

Daß diese B-Receptoren des Mäuseorgan-Kaninchenserums tatsächlich dieselben sind wie diejenigen im Ziegenblut-Kaninchenserum (Z-K-S), zeigt ein weiterer Vergleichsversuch. Behandelt man Ziegenblut mit Z-K-S im Überschuß, so binden die Zellen nachher kein Z-M-S mehr; denn Z-K-S enthält A und B. Behandelt man umgekehrt Ziegenblut mit Z-M-S, so binden die Zellen nachher zwar weniger, aber immer noch reichlich Hämolysine des Z-K-S. Das Z-M-S hat also im Gegensatz zum Z-K-S nur einen Teil der Receptoren verstopft, nämlich nur die A-Receptoren, während es die B-Receptoren freigelassen hat (siehe Tabelle X).

Tabelle X.

Bindung von Ziegen-Meerschweinchenserum und Ziegen-Kaninchenserum mit Ziegenblut. Wechselweise Verstopfung von Ziegenblut mit Ziegen-Meerschweinchenserum und Ziegen-Kaninchenserum.

Ziegen-Meerschweinchenserum (Titer AE. = 0,002 ccm), Ziegen-Kaninchenserum (Titer AE. = 0,001 ccm).

A. Bindungsversuch.

Zunächst wird bestimmt, wieviel lösende Dosen 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut aus den beiden Seren bindet. Technik wie oben.

I. Ziegen-Meerschweinchenserum Serummenge	Abgußhämolyse	II. Ziegen-Kaninchenserum Serummenge	Abgußhämolyse
0,6 $^1/_{100}$ = 3 AE. . .	w	0,7 $^1/_{10}$ = 70 AE. . .	w
0,8 $^1/_{100}$ = 4 „ . . .	m	0,8 $^1/_{10}$ = 80 „ . .	m
1,0 $^1/_{100}$ = 5 „ . . .	fc	0,9 $^1/_{10}$ = 90 „ . .	st—m
0,12 $^1/_{10}$ = 6 „ . . .	c	1,0 $^1/_{10}$ = 100 „ . .	st—m
0,14 $^1/_{10}$ = 7 „ . . .	c	0,11 $^1/_1$ = 110 „ . .	c
		0,12 $^1/_1$ = 120 „ . .	c

0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut hat also aus dem Meerschweinchenserum 4 AE., aus dem Kaninchenserum dagegen 100 AE. gebunden.

B. 1. Verstopfung von Ziegenblut mit Ziegen-Kaninchenserum.

Nun wurden 5,0 ccm 5 proz. Ziegenblut mit 1,5 ccm Ziegen-Kaninchenserum = 1500 AE. entsprechend den Vorversuchen im Volum 15,0 ccm 1 Stunde im

Brutschrank gehalten und zentrifugiert. (Auf 0,5 ccm Blut 150 AE.) 2,0 ccm Abguß bereitet komplette Lösung von 0,5 ccm 5 proz. Blut. Abguß entfernt, Bodensatz mit 5,0 ccm Kochsalzlösung aufgeschüttelt. Mit je 0,5 ccm der so erhaltenen Erythrocytenaufschwemmung wurde nun ein zweiter Bindungsversuch mit Ziegen-Meerschweinchenserum analog A. gemacht mit folgendem Resultat:

Serummenge	Hämolyse d. Abgusses
0,2 $^1/_{100}$ = 1 AE.	c
0,4 $^1/_{100}$ = 2 „	c
0,8 $^1/_{100}$ = 4 „	c

Auch nach Zusatz von 1 AE. Ziegen-Meerschweinchenserum zu den mit Ziegen-Kaninchenserum vorbehandelten Ziegenblutkörperchen löst der Abguß noch komplett. Die Receptoren der Erythrocyten sind also völlig verstopft.

B. 2. Verstopfung von Ziegenblut mit Ziegen-Meerschweinchenserum.

5,0 ccm 5 proz. Ziegenblut werden mit 0,2 ccm Ziegen-Meerschweinchenserum = 100 AE. im Volumen 15,0 ccm, wie oben, behandelt. 1,0 ccm des Abgusses löste 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut komplett. Zu je 0,5 ccm der also „gesättigten" Blutkörperchensuspension werden steigende Mengen Ziegen-Kaninchenserum zugesetzt und nach der Bindung der Abguß, wie oben, geprüft mit folgendem Resultat:

Serummenge	Hämolyse d. Abgusses
0,25 $^1/_{100}$ = $2^1/_2$ AE. . .	st
0,5 $^1/_{100}$ = 5 „ . .	st—m
0,75 $^1/_{100}$ = $7^1/_2$ „ . .	c
1,0 $^1/_{100}$ = 10 „ . .	c
0,25 $^1/_{10}$ = 25 „ . .	c

Nach der Behandlung mit Ziegen-Meerschweinchenserum hat das Bindungsvermögen des Ziegenbluts für Ziegen-Kaninchenserum bedeutend abgenommen, es werden aber noch mindestens 5 AE. gebunden. Das Ziegen-Meerschweinchenserum war also nicht imstande, alle Receptoren des Ziegenbluts zu verstopfen.

Sind nun darüber hinaus die B-Receptoren von Maus- und Meerschweinchenorganen identisch? Diese Frage muß zuerst einmal bejaht werden, denn wenn es nicht der Fall wäre, so müßte die Behandlung von Meerschweinchen mit Mäuseorganen zur Ziegenbluthämolysinbildung führen, was jedoch, wie oben schon gesagt, nicht der Fall ist. Immerhin schließt der Versuch es nicht völlig aus, daß in Mäuse- bzw. Meerschweinchenorganen spezifische Ziegenblutreceptoren in so geringer Menge vorhanden sind, daß sie sich unseren Prüfungen auch im Bindungsversuch entziehen; daß aber gewisse Unterschiede zwischen den Mäuse- und Meerschweinchen-Ziegenblutreceptoren bestehen, zeigten die früher besprochenen Versuche. Nach diesen binden Meerschweinchenorgane aus Meerschweinchenorgan-Kaninchenserum mehr AE. als aus Mäuseorgan-Kaninchenserum. Umgekehrt binden Mäuseorgane und Mäuse-

organ-Kaninchen-Serum mehr als aus Meerschweinchenorgan-Kaninchenserum. Es bestehen hier also zumindest Unterschiede in der Avidität. Wir können also von einer Receptor B-Maus und einem Receptor B-Meerschweinchen sprechen, ohne damit zu entscheiden, ob es sich hier um tatsächliche Artunterschiede handelt. Jedenfalls sind die beiden B-Receptoren auch im Ziegenblut vorhanden. In derselben Weise können irgendwelche Tierorgane untersucht werden, ohne weitere Aufschlüsse, wie es z. B. für die Hundemilz durchgeführt wurde.

Während also die Receptoren der verschiedenen Organzellen weitgehende Verwandtschaft untereinander zeigen, tritt bei Versuchen mit Mäuseerythrocyten eine völlig neue, nur den Mäuseblutkörperchen eigentümliche Receptorengruppe C hervor. Behandelt man ein Kaninchen mit Mäuseblut, so entstehen dabei Mäusehämolysine. Das erhaltene Immunserum ist imstande, bei Komplementzusatz Mäuseblutkörperchen im Reagensglas aufzulösen. Auf Eigentümlichkeiten, welche bei diesem Versuch zutage treten, soll erst später eingegangen werden. Dagegen wirkt das Hämolysin nicht auf Ziegenblutkörperchen. Der Mäuseerythrocyt hat also keine Ziegenblutreceptoren und unterscheidet sich dadurch scharf von der Mäuseorganzelle (siehe Tabelle XI).

Tabelle XI.

Immunisierung von Kaninchen mit Mäuseblut.

Schwarz-Weiß 43.

25. II. Zirka 2,5 ccm gewaschenes Mäuseblut intraperitoneal.
5. III. Komplett lösende Dosis für Ziegenblut: 0,025.
8. III. Zirka 3,5 ccm gewaschenes Mäuseblut intraperitoneal.
13. III. Hämolyse für Ziegenblut: 0,025 mäßig.
4,0 ccm gewaschenes Mäuseblut intraperitoneal.
18. III. Entblutet.
1. IV. Serum vom 18. III. komplett lösende Dosis für 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut 0,025.
17. IV. Serum vom 18. III. komplett lösende Dosis für 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut 0,25.
Serum vom 18. III. komplett lösende Dosis für 0,5 ccm 5 proz. Mäuseblut 0,3.
16. V. Serum vom 18. III. komplett lösende Dosis für 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut 0,05.
Serum vom 18. III. komplett lösende Dosis für 0,5 ccm 5 proz. Mäuseblut 0,006.
20. V. Serum vom 18. III. komplett lösende Dosis für 0,5 ccm 5 proz. Mäuseblut 0,008.

Andererseits besitzt, wie aus den früheren Untersuchungen bekannt ist, die Mäuseorganzelle keine Receptoren für Mäuseblut, denn Immunisierung von Kaninchen mit Mäuseorganen gibt niemals ein Mäusehämolysin. Der Mangel des Mäuseblutes an Ziegenreceptoren ergibt sich weiterhin daraus, daß Mäuseblut aus einem Z-K-S keine Ziegen-

hämolysine zu binden vermag (siehe Tabelle XII), während umgekehrt Ziegenblut aus dem Mäuseblut-Kaninchenserum (Ms-Bl-K-S) keine Mäusehämolysine herausnimmt (siehe Tabelle XIII).

Tabelle XII.

Bindung von Mäusenieren-Kaninchenserum mit Mäuseblut und Ziegenblut.

1,2 ccm eines Mäusenieren-Kaninchenserums (= 200 AE.) werden mit je 2,5 ccm 10 proz. Aufschwemmungen von Mäuse- und Ziegenblut eine Stunde im Brutschrank und bis zum anderen Tag im Eisschrank gehalten. Von dem Bodensatz wird die klare überstehende Flüssigkeit abpipettiert und gegen 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut eingestellt.

	A. Mäuseblut	B. Ziegenblut
0,5 $^1/_1$ = 27 AE.	c	Spchen
0,5 $^1/_{10}$ = $2^3/_4$ AE. . . .	c	0
0,25 $^1/_{10}$ = $1^1/_3$ AE. . . .	c	0

Tabelle XIII.

Bindung von Mäuseblut-Kaninchenserum mit Mäuseblut und Ziegenblut.

1,6 ccm des Mäuse-Erythrocyten-Kaninchens = 200 AE. für Mäuseblut werden mit je 2,5 ccm 10 proz. Mäuseblut- und Ziegenblutaufschwemmung eine Stunde im Brutschrank gehalten und bis zum folgenden Tag im Eisschrank absitzen lassen. Die Abgüsse werden dann gegen 0,5 ccm 5 proz. Mäuseblut eingestellt mit folgendem Ergebnis:

	Mäuseblut	Ziegenblut
1,0 $^1/_1$ = 50 AE..	c	c
0,75 $^1/_1$ = 38 „	fc	c
0,5 $^1/_1$ = 24 „	st	c
0.25 $^1/_1$ = 13 „	m	c
1,0 $^1/_{10}$ = 5 „	w	c
0,5 $^1/_{10}$ = $2^1/_2$ AE.. . . .	sw	c
0,25 $^1/_{10}$ = $1^1/_4$ „	0	c

Das Mäuseblut hat also von den dargebotenen 200 AE. ca. 195 gebunden = 98%. Dagegen zeigte Ziegenblut keine nachweisbare Bindung für das Mäusehämolysin.

Der Receptor C ist also als ein den Mäuseerythrocyten spezifischer anzusehen, der weder in den Mäuse- oder Meerschweinchenorganen noch im Ziegenblut vorkommt.

Ob darüber hinaus ein allen Mäuseorganzellen, einschließlich der Erythrocyten, gemeinsamer Receptor x existiert, der entweder in den Ziegenblutkörperchen fehlt oder im Kaninchen vorhanden ist, entzieht sich unserer Kenntnis.

In den obigen Versuchen zeigte sich der Receptorenapparat des Ziegenblutes als ein recht komplizierter. Es wird nun nötig sein, noch eine weitere Receptorengruppe der Ziegenblutkörperchen zu besprechen,

nämlich diejenige, welche es mit dem Rinderblut gemeinsam hat. Durch Immunisierung mit Rinderblut und mit Ziegenblut erhält man Rinderhämolysine sowohl beim Kaninchen (*Ehrlich* und *Morgenroth*), wie beim Meerschweinchen [*Weil*[1])]. Die beiden Blutarten haben also die Antigenfunktion, Rinderhämolysine zu erzeugen, gemeinsam. Dementsprechend bindet denn auch Ziegenblut aus einem Z-Bl-K-S oder Z-M-S nicht nur die Ziegenhämolysine, sondern auch die Rinderhämolysine (siehe Tabelle XIV).

Tabelle XIV.

Bindung von Ziegen-Meerschweinchenserum mit Rinderblut.

Steigende Mengen eines Ziegen-Meerschweinchenserums werden mit je 0,5 ccm 5 proz. Rinderblut (AE. dafür = 0,05 ccm) im Volumen 1,5 ccm eine Stunde im Brutschrank gehalten, zentrifugiert und der Abguß unter Zusatz von 0,05 ccm Meerschweinchenserum gegen 0,5 ccm 5 proz. Rinderblut geprüft mit folgendem Resultat:

Serummenge	Hämolyse für Rinderblut
0,5 $^1/_{10}$ = 1 AE. für Rinderblut	w
1,0 $^1/_{10}$ = 2 „ „ „	m
0,15 $^1/_1$ = 3 „ „ „	st—m
0,2 $^1/_1$ = 4 „ „ „	st
0,25 $^1/_1$ = 5 „ „ „	c

Rinderblut hat hier also erst von 5 dargebotenen AE. eine ungebunden gelassen.

In einem zweiten Teil des Versuches wurden 1,5 ccm 5 proz. Rinderblut mit 0,15 ccm desselben Serums im Volumen 4,5 ccm eine Stunde im Brutschrank gehalten. Dann wurde zentrifugiert und der Abguß gegen 0,5 ccm 5 proz. Ziegenblut unter Zusatz von 0,05 ccm Meerschweinchenserum eingestellt.

Abgußmenge	Hämolyse Ziegenblut
0,3 $^1/_1$ = 14 AE. für Ziegenblut . . .	c
0,1 $^1/_1$ = $4^1/_2$ „ „ „ . . .	c
0,3 $^1/_{10}$ = $1^1/_4$ „ „ „ . . .	c
0,21 $^1/_{10}$ = 1 „ „ „ . . .	c

Das Rinderblut hat also die Ziegenhämolysine des Ziegen-Meerschweinchenserums nicht gebunden.

Ziegenblut und Rinderblut haben also eine Receptorengruppe gemeinsam, diese fehlt aber den Meerschweinchen-, Mäuse- usw. Organen, denn einmal enthalten, wie schon *Forssman* angab, die Meerschweinchenorgan-Kaninchensera keine Rinderhämolysine, und dasselbe gilt auch für die Mäuseorgan- und die übrigen Tierorgan-Ziegensera. Weiterhin

[1]) Die entgegengesetzte Angabe *Schiffs* ist also zu korrigieren. Da die Meerschweinchenorgane selbst keine Rinderblutreceptoren besitzen (*Forssman*), so ist auch kein Grund vorhanden, daß die Rinderreceptoren im Meerschweinchen nicht zur Wirkung kämen.

aber weist doch die Tatsache, daß Meerschweinchen und Mäuse Rinderhämolysine bilden können, daraufhin, daß sie selbst diese Receptoren nicht besitzen. Die dem Rinder- und Ziegenblut gemeinsame Receptorengruppe ist also von der bisher beschriebenen verschieden und wird daher mit D bezeichnet.

Weitere Aufspaltung dieser Gruppe D im Verstopfungsversuch gelang nicht, vielmehr erwiesen sich hier die Rinderhämolysine von Z-K-S, Z-M-S und R-M-S (Rinderblut-Meerschweinchenserum) als identisch; denn Rinderblutkörperchen, welche mit Z-K-S oder R-M-S vorbehandelt waren, binden keine Rinderhämolysine aus Z-M-S mehr (siehe Tabelle XV u. XVI).

Tabelle XV.

Immunisierung von Meerschweinchen mit Rinderblut.

14. VII. 4 Meerschweinchen erhalten je 5,0 ccm gewaschenes Rinderblut intraperitoneal.
16. VII. Ein Tier +.
21. VII. 2 Tiere krank; alle 3 überlebenden Tiere werden entblutet, das Serum zusammengegossen und inaktiviert. AE. für 0,5 ccm 5 proz. Rinderblut 0,02 ccm.

Durch einmalige Injektion von Rinderblut gelang es also, beim Meerschweinchen Rinderhämolysine von etwa der Stärke zu erzielen, wie die des Z-M-S und des Z-K-S.

Das R-M-S löste Ziegenblut nicht.

Tabelle XVI.

Je 10,0 ccm 5 proz. Rinderblut werden im Volumen 30,0 ccm eine Stunde im Brutschrank digeriert mit

a) 1,0 ccm Ziegen-Meerschweinchenserum = 50 AE.
b) 2,5 „ Ziegen-Kaninchenserum = 50 AE.
c) 2,0 „ Rinder-Meerschweinchenserum = 100 AE.

Dann wird zentrifugiert. und der Bodensatz mit je 10,0 ccm Kochsalzlösung aufgeschüttelt.

Steigende Mengen von Ziegen-Meerschweinchenserum werden nun zugesetzt zu je 0,5 ccm von 1. 5 proz. Rinderblut (a), 2. mit Ziegen-Kaninchenserum vorbehandeltem Rinderblut (b), 3. mit Rinder-Meerschweinchenserum vorbehandeltem Rinderblut (c). Nach einer Stunde Brutschrank wird zentrifugiert, und der Abguß mit 0,5 ccm 5 proz. Rinderblut und 0,05 ccm Meerschweinchenserum geprüft mit folgendem Resultat:

	Hämolyse des Abgusses von		
	1.	2.	3.
Zugesetzte Menge von Ziegen-Meerschweinchenserum	Rinderblut nativ	Rinderblut vorbehandelt mit Ziegen-Kaninchenserum	Rinderblut vorbehandelt mit Rinder-Meerschweinchenserum
0,2 $^1/_{10}$ = 1 AE.	w	c	c
0,4 $^1/_{10}$ = 2 „	m—w	c	c
0,6 $^1/_{10}$ = 3 „	c	c	c

Natives Rinderblut bindet also 2 AE. aus dem Z-M-S, eine Zahl, die etwa dem entspricht, was wir auch für die Rinderamboceptoren des Z-K-S fanden.

Das mit Z-K-S und R-M-S vorbehandelte Rinderblut hat dagegen aus dem Z-M-S keine Rinderhämolysine mehr gebunden. Beide Sera müssen also Amboceptoren enthalten, welche denen des Z-M-S gleichen.

Der umgekehrte Versuch, nämlich eine vergleichende Verbindung des Z-K-S an mit Z-M-S und R-M-S vorbehandelte Rindererythrocyten konnte nicht einwandfrei durchgeführt werden, weil die Abgüsse eine antikomplementäre Wirkung zeigten. Nach Zusatz der doppelten Menge von Meerschweinchenserum lösten jedoch auch hier alle Abgüsse komplett, während natives Rinderblut in Übereinstimmung mit dem vorn geschilderten Versuch 3 AE. des Z-K-S band.

Wegen derselben antikomplementären Wirkung der Abgüsse, die ja auch ziemlich große Serummengen enthielten, konnte die Bindungsgröße des R-M-S nicht festgestellt werden. Doch scheint es, daß sie um ca. 10 AE. herum liegt.

Dagegen gelang es, Rinderblut mit R-M-S für Z-M-S und Z-K-S völlig zu verstopfen. Mit den obenerwähnten Aufschwemmungen vorbehandelter Erythrocyten wurden Bindungsversuche mit R-M-S angestellt, bei denen die Abgüsse mit 1—5 AE. komplett lösten. Die größere Serummengen enthaltenden Abgüsse jedoch hemmten unregelmäßig. Immerhin ergab der Versuch, daß nach der Behandlung mit R-M-S sowohl die Rinderamboceptoren des Z-M-S wie die des Z-K-S nicht mehr gebunden wurden, daß also das R-M-S diesen, in beiden Seren identischen, Antikörper ebenfalls enthält.

Es gelang also der Nachweis eines gemeinsamen rinderhämolytischen Amboceptors im Z-K-S, Z-M-S und R-M-S, der gleichzeitig der einzige derartige des Z-M-S und Z-K-S ist.

Es wäre nun anzunehmen, daß im Rinderblut darüber hinaus noch eine weitere im Ziegenblut nicht vorhandene Receptorengruppe vorkommt. Da diese Frage für die Analyse der Ziegenblutreceptoren belanglos war, blieb sie unentschieden.

Überblickt man die Versuchsergebnisse, so fällt vor allem der Receptorenreichtum des Ziegenblutkörperchens auf. Dieses besitzt eine ganze Reihe verschiedener Receptoren, welche sich streng voneinander scheiden lassen. Gemeinsam ist ihnen allen, daß sie mit dem entsprechenden Amboceptor beladen, die Hämolyse der Zellen vermitteln (A, B, D). Eine Reihe von Organzellen verschiedener Tiere besitzen ebenfalls derartige Receptoren, jedoch ausschließlich von der Art der Gruppe B. Immunisiert man nun Kaninchen mit Ziegenblut oder mit den Organzellen der Meerschweinchen usw., so erhält man dadurch Hämolysine, die ausschließlich durch die zur Immunisierung benutzten

Receptoren gebunden werden. Die Bildung dieser Amboceptoren im Tier ist jedoch nicht nur von der Wahl des immunisierenden Antigens abhängig, sondern auch von der Wahl der zur Immunisierung benutzten Tierart. Hat eine Spezies in ihren Organzellen eine Receptorengruppe, welche mit einer solchen des Antigens gleichartig ist, so wird sie gegen diese Receptorengruppe keine Antikörper bilden können; z. B. ist B bei Meerschweinchen unwirksam, da Meerschweinchenorgane selbst B enthalten. *Hieraus ergibt sich ohne weiteres, daß Immunsera, die zwar mit demselben Antigen, jedoch bei verschiedenen Tierarten gewonnen sind, verschiedene Antikörper enthalten können.* So besitzt Z-K-S Antikörper gegen Receptor A, B und D, Z-M-S nur gegen A. *Die Wahl des Serumspenders ist also für die Art des erhaltenen Immunserums von ausschlaggebender Bedeutung.*

Nun erklären sich auch die Unterschiede in der Avidität, welche die von verschiedenen Tieren mit demselben Antigen erhaltenen Immunsera später diesem Antigen gegenüber zeigen. Die auffallende Tatsache, daß Ziegenblutkörperchen aus dem Z-M-S nur wenige AE., aus dem gleichstarken Z-K-S jedoch ein Vielfaches davon zu binden imstande sind, findet so seine Deutung. Es konnte gezeigt werden, daß im Kaninchen die 3 Receptorengruppen A, B und D des Ziegenbluts zur Bildung von Ziegenbluthämolysinen führen. Im Meerschweinchen dagegen erzeugt nur die Gruppe A ziegenhämolytische Antikörper. Bringt man nun im vergleichenden Bindungsversuch Ziegenblut mit den beiden Immunseren zusammen, so können sich in dem Z-M-S nur die A-Receptoren beladen, da es ja nur A-Antikörper enthält; und wenn alle A-Receptoren verstopft sind, so ist die Bindungskraft des Ziegenbluts anscheinend erschöpft. In einem Z-K-S dagegen finden nicht nur die A-Receptoren, sondern auch noch B- und D-Receptoren Gelegenheit, sich mit Hämolysin zu beladen. Aus einem ziegenhämolytischen Kaninchenserum wird also Ziegenblut mehr lösende Dosen binden können, als aus einem gleichstarken Meerschweinchenserum. Das Kaninchenserum ist avider als das Meerschweinchenserum. Es ist bekannt, daß eine Antigenmenge aus einem hochwertigen Immunserum mehr Einheiten binden kann, als aus einem niederwertigen. Schaltet man derartige Faktoren, welche für die Aviditäten auch ihrerseits bestimmend sind, aus, so wird man sagen können, daß die Avidität eines Immunserums um so größer ist, je mehr verschiedenartige Receptoren des Antigens im Körper des Serumspenders zur Antikörperbildung gelangen. *Die Avidität ist also umgekehrt proportional der Größe der Receptorengemeinschaft zwischen Antigen und Serumspender.*

Weil hat aus der zuerst unerklärlich scheinenden Tatsache der verschiedenen Avidität von Z-M-S und Z-K-S auf die Unbrauchbarkeit des Bindungsversuches geschlossen. Dieser Schluß wäre jedoch nur dann

gerechtfertigt, wenn die zugrunde liegende Voraussetzung, nämlich die Identität der im Kaninchen und Meerschweinchen tatsächlich zur Wirkung kommenden Ziegenblutreceptoren zuträfe und damit die Ergebnisse des Bindungsversuchs zu offenbaren Widersprüchen führten.

Aus den vorhergehenden Versuchen dürfte sich jedoch ergeben, daß das Verhalten der Kaninchen- und Meerschweinchenimmunsera im Bindungsversuch gut mit den Anschauungen über die Partialreceptoren, wie es auch die Immunisierungs-, Bindungs- und Verstopfungsversuche zeigen, übereinstimmt. Unter Ablehnung der Schlüsse *Weils* gelangt man also zu der Anschauung, daß die Avidität eines Immunserums abhängig ist von Partialreceptorendifferenzen zwischen Antigen und Serumspender.

Zusammenfassung.

1. Ziegenblut besitzt eine Receptorengruppe, welche in den Organzellen von Meerschweinchen, Maus usw. *nicht* vorkommt = Receptor A.

2. Ziegenblut besitzt eine Receptorengruppe, welche in den erwähnten Organzellen *vorhanden* ist = Receptor B.

3. Mäuseerythrocyten besitzen die B-Receptoren nicht, sondern nur die in Ziegenblut und den Organen von Meerschweinchen, Maus usw. nicht vorhandenen Receptoren C.

4. Ziegenblut besitzt eine Receptorengruppe D, welche in den Organzellen der verschiedenen Tierarten und im Mäuseblut nicht vorkommt, dagegen in den roten Blutkörperchen des Rindes vorhanden ist.

5. Hämolytische Immunsera, welche mit demselben Antigen bei verschiedenen Tierarten gewonnen wurden, erscheinen verschieden avid, d. h. dieselbe Antigenmenge bindet aus ihnen verschiedene Mengen von AE.

6. Hämolytische Sera sind unter sonst gleichen Bedingungen (z. B. gleicher Titer) um so avider, je geringer die Receptorendifferenz zwischen dem Antigen und dem Serumspender ist.

Die Avidität eines hämolytischen Serums ist abhängig von den antigenen Eigenschaften der Organzellen des Serumspenders. Enthalten die Körperzellen des Serumspenders eine größere Anzahl von partiellen Receptoren, welche auch in den als Antigen benutzten roten Blutkörperchen vorhanden sind, so erhält man ein hämolytisches Serum von geringerer Avidität. Umgekehrt bildet ein Tierkörper dann sehr avide hämolytische Immunsera, wenn er keine oder nur wenig partielle Receptorengruppen mit dem immunisierenden Antigen gemeinsam hat.

Amboceptoren und Receptoren[1]).

III. Mitteilung.

Über intravitale Bindung von Zellantikörpern.

Von

J. Morgenroth und **R. Bieling.**

(Eingegangen am 2. Mai 1922.)

Unregelmäßigkeiten, welche sich bei der Prüfung der Wertigkeit von Mäusebluthämolysinen im Reagensglas ergaben, führten dazu, eine Prüfung und Wertbestimmung im Tierkörper zu versuchen. Injiziert man einem Kaninchen, welches mit Rinder- oder Hundeblut vorbehandelt ist, wiederum die verschiedenen Erythrocyten, so tritt intravitale Hämolyse und Hämoglobinurie auf [*Rehns*[2]), *Sachs*[3])]. Genau wie im Reagensglas bindet also das injizierte Antigen den im vorbehandelten Körper vorhandenen Amboceptor und dieser Komplex wird durch das Komplement des Serums komplettiert. Umgekehrt tritt intravitale Hämolyse und Hämoglobinurie mit Ikterus beim Meerschweinchen ein, welchem man das Serum von Kaninchen injiziert, die mit Meerschweinchenerythrocyten vorbehandelt wurden [*Savtschenko*[4]), *Gruber*[5])]. Die auffällige Angabe von *Savtschenko*, daß nur aktives Serum diese intravitale Hämolyse hervorrufe, entspricht nicht dem starken Gehalt an fertigem Komplement im Meerschweinchenserum. *Gruber* hat dann auch dieselben Resultate unter Verwendung von inaktivem Serum erhalten. In diesem Zusammenhang erscheinen nun Untersuchungen an der Maus von besonderem Interesse, denn das Serum der Maus enthält im Gegensatz zu dem des Kaninchens und Meerschweinchens kein vollständiges Komplement, sondern nur Mittelstück, während Endstück fehlt [*Ritz*[6])]. Mit Mäuseserum gelingt also die Aktivierung eines Antigen-Amboceptorgemisches im Reagensglas nicht und zwar, wie hinzugefügt werden soll, auch dann nicht, wenn man zur Komplementprüfung Mäuseblutkörperchen und inaktives Ms-Bl-K-S wählt. Es mußte daher

---

[1]) I. u. II. Mitt. s. diese Zeitschr. **68**, **85**, 1915 und **131**, 1922. Die Versuche wurden im Jahre 1913 in der Bakteriologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin ausgeführt.

[2]) Cpt. rend. soc. de biol. 332. 1901.

[3]) *Kolle* und *Wassermann*, 2. Aufl., Bd. 2, S. 865.

[4]) Ann. Inst. Pasteur **16**, 106. 1902.

[5]) Münch. med. Wochenschr. 1901, Nr. 48 u. 49.

[6]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **9**, 321. 1911.

erwartet werden, daß auch im Organismus der Maus die Komplettierung eines Antigen-Amboceptorgemisches nicht oder doch in wesentlich anderer Weise erfolge, als bei den Tieren mit fertigem Komplement im strömenden Blut.

In einer aus *Morgenroths* und *Minkowskis* Laboratorium hervorgegangenen Arbeit machte *F. Rosenthal*[1]) auf die wichtige Divergenz der trypanolytischen resp. hämolytischen Wirkung des Mäuseblutes in vitro und in vivo aufmerksam. Intravenös injicierte Trypanosomen unterliegen bei Mäusen, die 24 Stunden vorher durch Bruchweinstein von einer Trypanosomeninfektion geheilt worden waren, einer rapiden Trypanalyse in der Circulation. Ebenso werden Taubenblutkörperchen bei intravenöser Injektion in entsprechend vorbehandelte Mäuse außerordentlich schnell aufgelöst, während das Serum in vitro keinerlei hämolytische Wirkung ausübt. *Rosenthal* schließt daraus, daß in vivo Complement bei Mäusen vorhanden sein muß und daß vielleicht beim Entbluten „anticomplementive Prozesse" im Serum auftreten.

Die folgenden Versuche zeigen, daß auch bei der Maus mit Regelmäßigkeit und sogar noch viel rascher als beim Meerschweinchen intravitale Hämolyse eintritt, wenn man den Tieren inaktives Mäusehämolysin injiziert.

Tabelle I.

Injektion von Mäuseblut-Kaninchen-Serum bei der weißen Maus.

A. 6. III.

7 weiße Mäuse werden mit fallenden Dosen (1,0—0,05 ccm) inaktivierten Serums eines normalen Kaninchens intraperitoneal gespritzt. Am folgenden Tag sind die Tiere, welche 1,0—0,8 und 0,6 ccm Serum erhielten, krank, erholen sich aber sehr bald wieder. 0,05—0,4 ccm normales Kaninchenserum wird reaktionslos vertragen; Dosen bis zu 1,0 ccm rufen nur vorübergehende Schädigungen hervor.

B. 31. III.

6 Mäuse werden mit fallenden Dosen Mäuseblut-Kaninchen-Serum intraperitoneal gespritzt.

Maus	Gew.	Serummenge	Befund an den folgenden Tagen
Kopf rot.	16 g	1,0	1. IV. Deutliche ikterische Verfärbung der Ohren.
Nacken rot. . . .	14 g	0,8	
Rücken rot. . . .	14 g	0,6	†, Sektion: Starke Hämoglobinurie, dunkelbraune Krümel im Harn. Milz vergrößert und tief dunkelrot, fast schwarz.
Steiß rot.	$13^1/_2$ g	0,4	1. IV. Lebt, starke Hämoglobinurie. 2. IV. Hämoglobinurie wie am Vortag, wenig geformte Bestandteile. 3. IV. Nur mikroskopisch noch Blutkörperchenzylinder. Albumen + bis zum 9. IV. Gleichzeitig wird das vorher ruhig dasitzende Tier wieder munter.

[1]) Zeitschr.f. Hyg. 74, 489. 1913.

Maus	Gew.	Serummenge	Befund an den folgenden Tagen
Schwanz rot . . .	15 g	0,2	1. IV. Lebt. Mäßige Hämoglobinurie.
			2. IV. Hämoglobinurie unverändert. Albumen +.
			3. IV. Hämoglobin und Albumen —.
Bauch rot	13 g	0,1	1. IV. Lebt. Kein Hämoglobin und Eiweiß im Urin.

Dosen von 0,6—1,0 ccm Serum wirken demnach tödlich für 14 g Maus. Die Tiere zeigen Ausscheidung von Blutzerfallsprodukten durch den Harn und hämolytischen Ikterus. Dosen von 0,4—0,2 ccm bewirken ebenfalls eine, wenn auch etwas schwächere Hämoglobinurie. Dagegen ist 0,1 ccm unwirksam.

Spritzt man also eine Maus mit einer geeigneten Menge eines Immunserums, welches durch Behandlung von Kaninchen mit gewaschenen Mäuseblutkörperchen erhalten wurde, so tritt bei der Maus innerhalb 24 Stunden ein starker Zerfall der Erythrocyten auf, die Hämoglobinämie wird zur Hämoglobinurie und zum hämolytischen Ikterus. Große Dosen des Serums töten dabei die Maus. Mittlere Dosen rufen nur eine vorübergehende mehrtägige Ausscheidung von Blutfarbstoff hervor, von der sich die Tiere wieder erholen. Noch kleinere Dosen machen keine erkennbaren Symptome mehr. Obwohl also in dem Serum der Maus das zur Komplementwirkung notwendige Endstück fehlt, kommt dennoch im Tierkörper selbst die Hämolyse zustande. Daraus ergibt sich, daß der Komplementgehalt des Serums allein nicht ausschlaggebend sein kann für das Zustandekommen der Amboceptoraktivierung und daß die Maus in ihren Organen genügende Mengen wirksamen Komplements besitzt. Hierauf wies auch schon die Tatsache hin, daß Mäuse anaphylaktisch gemacht werden können (*Ritz, v. Sarnowski*). Freilich wird man annehmen müssen, daß dieses Endstück im Gegensatz zu den übrigen Tierarten nicht frei im Serum kreist, sondern in den Organen festsitzt oder aber nur bei Bedarf produziert wird.

Auffallend war nun weiter, daß die Stärke der Wirkung der einzelnen Sera unabhängig war von dem hämolytischen Titer im Reagensglas, wie dies die folgende Zusammenstellung zeigt (Tabelle II).

Tabelle II.

Serum Nr.	Prüfung im Reagenzglas	Maus i. p.
20 vom 6. III.	6. III. keine komplette Hämolyse, starke Agglutination	1,0 Hämoglobinurie 0,8 keine Hämoglobinurie
43 vom 18. III.	1. IV. 0,3 c 16. V. 0,006 c 20. V. 0,008 c	31. III. 0,2 Hämoglobinurie 0,1 keine Hämoglobinurie
30 vom 13. III.	13. III. keine komplette Hämolyse, starke Agglutination	0,5 Hämoglobinurie 0,25 keine Hämoglobinurie

Dieser mangelnde Parallelismus zwischen Wirkung in vivo und in vitro dürfte in allererster Linie damit zu erklären sein, daß die Sera im Reagensglas eine sehr starke hämaglutinierende Wirkung ausüben, welche den Eintritt der Hämolyse verhindert. Daß außerdem das Serum

hemmende Körper enthält, ergibt sich wohl mit Deutlichkeit aus dem Befund mit Serum 43 (siehe Tabelle II). Die kleinste Dosis dieses Serums, welche 0,5 ccm 5 proz. Mäuseblut völlig auflöst, war 2 Wochen nach der Entnahme des Serums 0,3 ccm. Nach weiterem Ablagern durch $1^1/_2$ Monate jedoch löste dasselbe Serum noch in der Menge 0,006 ccm komplett, und eine Wiederholung des Versuches 4 Tage später ergab ungefähr denselben Wert. Es muß also angenommen werden, daß die im Reagensglas hemmenden Körper frischer Sera beim Lagern abnehmen, so daß die Wirkung in vitro dann ohne Hemmung nachgewiesen werden kann. Da sie jedoch im lebenden Organismus von Anfang an das Zustandekommen der Hämolyse nicht verhindern können, so wird man mit einem frischen Serum im Tierversuch eine stärkere Wirkung erzielen müssen als es der Reagensglasprüfung entspricht.

Diese Befunde sind noch von Bedeutung für die Erklärung der von *Kudicke*[1]) mitgeteilten Beobachtungen über Hämoglobinurie bei Mäusen, welche mit dem Serum einer mit trypanosomenhaltigen Mäuseblut immunisierten Ziege behandelt worden waren. Der mangelnde Parallelismus zwischen der Stärke der hämolytischen Wirkung in vitro und in vivo einerseits, sowie die Beobachtung, daß beim Ablagern der Sera die hämolytische Wirkung im Tier sich nicht gleichsinnig mit derjenigen im Reagensglas abschwächt, veranlaßten *Kudicke* dazu, Beziehungen zwischen der intravitalen Hämolysewirkung und der Trypanocidie seiner Sera als möglich zu diskutieren[2]). Die obigen Befunde weisen jedoch daraufhin, daß diese Unstimmigkeiten durch das Vorhandensein von Hemmungskörpern im frischen Serum erklärt werden können. Auch scheint es nicht ausgeschlossen, daß das Immunserum von Ziegen, welche mit Mäuseblut ohne Trypanosomen behandelt wurden, dieselbe hämolytische Wirkung hat, wie die trypanociden Sera: Kontrollversuche, über die *Kudicke* nicht berichtet.

Unberührt von diesen Einwänden bleibt der bemerkenswerte Hinweis auf die Bedeutung der Trypanosomeninfektion der Maus für das Zustandekommen der intravitalen Serumhämolyse.

Die Annahme, daß ein Teil der Mäusehämolysine sich deshalb dem Nachweis in vitro entziehe, weil sie dem *Donath-Landsteiner*schen Typ angehören, mußte fallengelassen werden, denn wenn man die Mäuse nach der Injektion von Mäusehämolysin 2 Minuten bis auf den Kopf in Wasser von 5—6° taucht, so gelingt es nicht mit kleineren Dosen als gewöhnlich eine Blutfarbstoffausscheidung durch den Harn zu erzielen.

Die vorliegenden Hämolyseversuche hatten gezeigt, daß es bei der Maus gelingt, die Amboceptoren eines inaktiven Serums im Körper an die lebende Gewebszelle zu fixieren und dadurch *in elektiver Weise*

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **61**, 113. 1911.

[2]) Vgl. *Bieling* und *Isaac*, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **25**, 8—14. 1921.

mit Hilfe des Komplements des behandelten Tieres eine *intravitale Zerstörung der betreffenden Körperzellen* vorzunehmen.

Da nun in den Mäusenieren und Mäusetumoren Antiseren-Antikörper von exakt meßbarer Menge vorliegen, war es naheliegend, auch hier entsprechende Versuche zu machen. Diese hatten jedoch von vornherein mit ungünstigen Bedingungen zu rechnen, da die betreffenden Organzellen-Antisera auf die Gesamtheit der Körperzellen wirkten, wenn auch auf die zur Immunisierung benutzte Zellart besonders stark und mit besonderer Avidität (s. I. Mitt.).

Dies hatte zur Folge, daß die mit Organantiserum intravenös gespritzten Tiere unter allgemeinen Vergiftungssymptomen starben, im Gegensatz zu den Angaben von *Doerr* und *Pick*, genau so wie Meerschweinchen, welche mit Meerschweinchenorgan- oder Pferdeorganserum behandelt wurden. Die Giftwirkung der Sera ist in diesen Versuchen recht verschieden und geht mit der Hämolysewirkung in vitro nicht immer deutlich parallel. Einzelne Sera wurden selbst in der Menge von 1,0 ccm intraperitoneal von der Maus glatt vertragen. Durchgängig giftiger waren die Tumorsera. Das Serum (11) (1 AE. = 0,002 ccm) tötet noch in Menge von 0,1 ccm intravenös eine weiße Maus von 19 g in wenigen Minuten. Im Hinblick auf diese allgemeine Giftwirkung der Organzellen-Antisera muß auch die Bedeutung gelegentlicher Eiweißbefunde im Urin von Mäusen, welche mit Ms-N-K-S behandelt wurden, dahingestellt bleiben. Niemals aber konnte durch ein Organantiserum auch nur eine geringe intravitale Hämolyse hervorgerufen werden, ein weiterer Beweis für die absolute Receptorendifferenz von Organzellen und Erythrocyten.

Dagegen konnte die Bindung des Tumorserums durch das Mäusecarcinom in der krebskranken Maus ebenso demonstriert werden, wie früher durch Bindung und Überspringsversuch im Reagensglas.

Zu diesem Zwecke wurde ein Tumorserum benutzt, dessen kleinste tödliche Dosis bei intravenöser Injektion 0,1 ccm betrug. Dieses Serum wirkte bei Tumormäusen weit langsamer und milder (siehe Tabelle III).

Tabelle III.

Behandlung von Tumormäusen mit Serum der Tumorkaninchen.

I. Serum: Tumortier 29.

A. 2 Mäuse mit kirschgroßen Tumoren erhalten 0,5 ccm intraperitoneal. (Dosis letalis minima intravenös 0,1 ccm/19 g; 1 AE. = 0,002.)

Tier 1 † am folgenden Tag.

Tier 2 † am 3. Tag. Sektion: Dicke Gerinnsel im Pleuralraum. Milz stark vergrößert und dunkelrot. Nieren groß und blaß. Tumor makroskopisch total nekrotisch.

B. 3 Mäuse mit kirschgroßen Tumoren erhalten 0,5 ccm intravenös.

Tier 1 † nach 10 Minuten.

Tier 2 † am folgenden Tag.

Tier 3 † am folgenden Tag.

II. Serum: Tumortier 29.

Maus 1 mit großem Tumor. 0,1 ccm intravenös: Keine Erscheinungen.

Dasselbe Tier erhält dann noch am 3. Tag 0,1 ccm intraperitoneal, am 7. Tag 0,2 ccm intraperitoneal.

Stirbt am 11. Tag mit stark blutig ulceriertem Tumor an Paratyphus.

Maus 2 mit kleinem Tumor. 0,1 ccm intravenös: Keine Wirkung.

Am 3. Tag 0,1 ccm intraperitoneal, † am folgenden Tag an Paratyphus.

Von 2 intraperitoneal mit 5 tödlichen Dosen behandelten Tieren starb das eine bis zum nächsten Tag, genau wie ein Normaltier, das andere jedoch überlebte die Injektion 3 Tage.

Nach der intravenösen Applikation ist, wie wir schon früher sahen, die Wirkung eine promptere. Aber nur eines der 3 mit 5 tödlichen Dosen gespritzten Tiere starb innerhalb von 10 Minuten, während die beiden anderen Tiere erst am nächsten Morgen tot waren, also mehrere Stunden gelebt haben. Die einfach tödliche Dosis jedoch wurde von 2 weiteren Tumortieren, selbst nach Wiederholung, mehrere Tage überlebt. Es ergibt sich hieraus, daß bei Tumormäusen die toxische Wirkung des Tumorserums hinausgezögert ist.

Man wird annehmen müssen, daß das Serum infolge seiner großen Avidität zu dem Tumorgewebe von diesem zum großen Teile abgefangen wird, und dadurch die akute allgemeine Vergiftung des Organismus verhindert oder verlangsamt wird.

Es lag nahe, derartige Ergebnisse als Grundlage zu Heilversuchen bei Tumormäusen zu benutzen, da die Möglichkeit bestand, daß der an die Tumorzelle gebundene Antikörper in ähnlicher Weise wie die Hämolysine wirken könnte. Ein exakter Beweis dafür, daß dies tatsächlich der Fall ist, konnte jedoch durch die betreffenden Versuche nicht erbracht werden. Denn wenn es auch mehrfach gelang, durch intravenöse Injektionen von Ms-T-K-S den Tumor zum nekrotischen Zerfall zu bringen, so sind die Versuche doch keineswegs zahlreich genug, um ein sicheres Urteil darüber zu gewinnen, ob die Bindung der Antikörper den schon normalerweise einsetzenden Zerfall der Geschwulstmassen zu beschleunigen vermag.

Zusammenfassung.

1. Injektion von inaktivem Serum von Kaninchen, welche mit Mäuseblutkörperchen vorbehandelt wurden, führt bei der Maus zur intravitalen Hämolyse mit Hämoglobinurie und hämolytischem Ikterus. Diese Erscheinung tritt auf, obwohl im Serum der Maus das Komplementendstück fehlt.

2. Tödliche Dosen von Mäusetumor-Kaninchen-Serum wirken bei Carcinommäusen verzögert oder überhaupt nicht tödlich. Die eingespritzten Krebsantikörper werden durch die Krebszellen des Körpers abgelenkt.

Untersuchungen über die Säurehämolyse und ihre Beeinflussung durch Calcium.

Von

Adolf Jarisch

(nach Versuchen mit cand. med. *Edgar Tonello*).

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz.)

(*Eingegangen am 3. Mai 1922.*)

Seit den Versuchen von *Loeb* an Funduluseiern ist bekannt, daß Calcium gegenüber Säure antagonistisch wirkt. Davon ausgehend haben wir den Einfluß des Ca auf die Säurehämolyse untersucht und dabei eine auffallende Erscheinung beobachtet, die uns einer näheren Analyse wert erschien.

Säurehämolyse in $CaCl_2$-Lösung.

Es wurden *Rinder*blutkörperchen in 0,9 proz. NaCl serumfrei gewaschen und dann in durch Gefrierpunktsbestimmung blutisotonisch gemachter $CaCl_2$-Lösung aufgeschwemmt und mit steigenden HCl-Mengen versetzt.

6% Blutk. in	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
isot. $CaCl_2$	4,9	4,73	4,83	4,79	4,72	4,64	4,54	4,4	4,23	4
$^n/_{50}$ HCl in isot. $CaCl_2$	0,1	0,13	0,17	0,21	0,28	0,36	0,46	0,6	0,77	1
nach 12h: Überstehende Lösung . . .	farblos	farblos	farblos	rötlich	rot	farblos	farblos	gelbl.	oliv	oliv
nach 12h: Sediment . . .	rot	rot	rot	rot	—	braun*)	braun*)	braun*)	—	—
nach 12h: somit Farbstoffaustritt (Lösung)	—	—	—	+	+ + +	—	—	+	+ + +	+ + +

*) Die Sedimentierung ist hier nicht vollkommen, die Blutkörperchen schweben noch zum Teil bis zur halben Höhe der Röhrchen.

Es ergab sich somit eine unregelmäßige Reihe folgender Art: Bei gleichbleibendem Ca-Gehalte und steigender Säuremenge erfolgt zunächst Hämoglobinaustritt wie bei der gewöhnlichen Säurehämolyse in NaCl, dann folgt eine Zone, in der der Farbstoffaustritt unterblieben ist und sich die Blutkörperchen wieder aus farbloser Lösung absetzen. Bei diesen Säurekonzentrationen hat sich das Hämoglobin in Säurehämatin verwandelt und deshalb sind die sedimentierten Blutkörperchen braun.

Die letzten Röhrchen sind wieder klar gelöst, die Farbe ist zwischen braun und olivgrün.

Gegenüber der Säurehämolyse in NaCl zeigt sich, von dieser Erscheinung abgesehen ein Unterschied noch darin, daß die erstmalige Lösung im Ca erst bei etwas höherer Säurekonzentration erfolgt, also eine geringe Hemmung der Säurehämolyse besteht und ferner darin, daß die im NaCl bei höheren Säuremengen regelmäßig eintretende Flockung brauner Substanzen unterbleibt. Dagegen erfolgt der Farbenumschlag durch Bildung des Säurehämatins im Ca und Na bei gleicher Säuremenge, also gleichgültig ob das Hämoglobin ausgetreten war oder nicht.

Mit Essigsäure wurde das gleiche Resultat erzielt wie mit HCl.

Um die Abhängigkeit der beobachteten Erscheinung von der H-Ionen konzentration der Lösung festzustellen wurden Versuche mit Regulatoren und zwar zunächst mit Essigsäure-Acetatmischungen angestellt und es ließen sich nun die einzelnen Zonen der unregelmäßigen Reihe den versschiedenen p_H wie folgt zuordnen 1a[1]):

p_H 4,7 . . . . erste Lösung,
p_H 4,4—3,5 . . . . . Hemmungszone
p_H 3,2 . . . . zweite Lösung.

Die zum Auftreten der Hemmungszone führende Veränderung der Blutkörperchen ist somit *eine Funktion der H*-Ionenkonzentration.

Die Erscheinung tritt nicht allein in reiner $CaCl_2$-Lösung auf, sondern auch in Ca-haltiger NaCl-Lösung und ist selbst noch bei einem Ca-Gehalte von 0,02% deutlich. Mit abnehmender Ca-Menge kommt die erwähnte Flockung brauner Substanzen bei höherer Säurekonzentration wieder zum Vorschein und von 0,1% abwärts wird die Hemmung weniger vollkommen und es färbt sich die überstehende Flüssigkeit in der Hemmungszone gelblich. Ferner wird die erste Lösungszone breiter, die Hemmungszone dagegen schmäler ohne aber ihre Lage zu ändern.

Das Auftreten der Hemmungszone ist also weitgehend *von der Ca-Menge unabhängig.*

Versuche mit den Blutkörperchen der Hemmungszone.

Es wurde das Verhalten der ungelöst gebliebenen Blutkörperchen der Hemmungszone gegenüber verschiedenen Hämolyticis geprüft mit dem Ergebnis, daß Auflösung nicht eintrat.

Die Blutkörperchen konnten mit 1 proz. Saponinlösung sowie 45 proz. Alkohol behandelt werden ohne sich zu verändern. Verdünnen mit destilliertem Wasser war belanglos, desgleichen Zusatz von HCl bis zu $^n/_{10}$. Nach Zusatz von Lauge bis zu einer der zur Vorbehandlung angewendeten Säuremenge äquivalenten Menge verwandelte sich die

[1]) Die Ziffern beziehen sich auf die Protokolle im Anhang.

braune Farbe wieder in Rot. Größere Laugenmengen, bis $^{n}/_{10}$-NaOH, bewirkten grünlichgelbe Verfärbung (Alkalihämatin), aber keine Auflösung.

Auch die Wärmehämolyse unterblieb und es konnte die Aufschwemmung sogar gekocht werden. Offenbar hatte sich Säureeiweiß gebildet, das bekanntlich in der Hitze nicht koaguliert, denn nach vorsichtiger Neutralisation trat sofort Koagulation ein.

In einer Reihe von Versuchen ließ sich feststellen, daß durch Abstumpfen der zur Vorbehandlung verwandten Säure durch eine äquivalente Laugenmenge und Auswaschen des Ca mit 0,9 proz. NaCl die Veränderung nur insofern rückgängig gemacht werden konnte als nunmehr in $^{n}/_{400}$-NaOH-Lösung wieder eintrat.

Die Versuche ergaben somit, daß die roten Blutkörperchen in Gegenwart von Ca bei Einwirkung von Wasserstoffionen in bestimmter Konzentration eine eigenartige Fixierung erfahren, die offenbar mit tiefgreifenden Veränderungen verbunden sind. Wenn diese Produkte der Ca-Säurebehandlung im folgenden noch als Blutkörperchen bezeichnet werden, so geschieht dies der Einfachheit halber.

Ultramikroskopische Beobachtungen.

Bei der Beobachtung der fixierten Blutkörperchen im Dunkelfelde nach *Bechhold* (Objektträger-Deckglaspräparat, Paraboloidkondensor) zeigten sie sich im Gegensatze zu den als helle leuchtende Ringe erscheinenden normalen Blutkörperchen als Kugeln, die mit zahlreichen, teils weiß, teils rötlich oder grünlich glänzenden Punkten und Körnchen erfüllt und besetzt sind. Diesen Eindruck gewinnt man besonders dann, wenn man durch Ansaugen mit Fließpapier eine Strömung erzeugt dann rollen die Blutkörperchen durch das Gesichtsfeld. Offenbar liegt ein Koagulationsprozeß vor, der wohl als Ursache der beobachteten Fixierung betrachtet werden darf.

Derartige Gerinnungsvorgänge im Inneren roter Blutkörperchen sind bei Anwendung von Eiweißfällungsmitteln schon beobachtet worden und zwar sahen sie ultramikroskopisch *Bechhold* und *Kraus* beim Sublimat, *Rohonyi* mit dem gewöhnlichen Mikroskop bei der Sulfosalicylsäure. Auch *Jodlbauer* und *Haffner* sahen derartiges bei ihren Wärmehämolyseversuchen. Beim Amphibienblut treten nach Essigsäure, Chromsäure und Jodtinktur Niederschläge in den Blutkörperchen auf. (*Meves, Schaffer.*)

Hervorzuheben ist, daß auch bei der Säurehämolyse in reiner NaCl-Lösung etwas ähnliches zu beobachten ist. Saugt man mit Fließpapier $^{n}/_{50}$-HCl durch ein Normalpräparat und beobachtet die am Glase haftenden Blutkörperchen, so sieht man sie beim Eintreffen der Säure plötzlich verlöschen; gleichzeitig treten aber im Inneren matte Granula auf, die an die oben beschriebenen hellleuchtenden der Ca-Blutkörperchen erinnern.

Durch diese Beobachtung aufmerksam gemacht, verfolgten wir den Ablauf der Säurehämolyse in reiner NaCl-Lösung auch makroskopisch genauer und konnten in der Tat die Hemmungszone andeutungsweise wiederfinden. Die Klärung der Röhrchen schritt nicht gleichmäßig vom sauren Ende aus fort, sondern es wurden mit einem Male Röhrchen im weniger sauren Teil klar, obwohl saurere noch trüb waren.

Ultramikroskopisch sieht man also eine *Gerinnung* in den Blutkörperchen, die in schwächerem Grade auch bei der Säurehämolyse in reiner NaCl-Lösung ohne $CaCl_2$ zu beobachten ist.

Der Umstand, daß die Hemmungszone auch in Ca-freier Lösung wiedergefunden werden konnte, beweist, daß offenbar eine Verstärkung eines auch ohne Ca eintretenden Vorganges vorliegt, und es ergaben sich daraus die Fragen, welcher Art einerseits der Gerinnungsvorgang sei und wodurch andererseits das Calcium wirke.

Da die Hemmungszone in einen scharf definierten p_H-Bereich fällt, war ein Zusammenhang mit Fällung der Stromasubstanz im isoelektrischen Punkte, wie sie zuerst von *Michaelis* und *Takahashi* beschriebenworden ist, nahegelegt. Dies zu prüfen bestand nun die Möglichkeit die elektrische Ladung der Blutkörperchen in der Hemmungszone zu bestimmen und ferner den isoelektrischen Punkt bzw. das Fällungsoptimum der Stromasubstanz für unsere Versuchsbedingungen aufzusuchen und deren Lage mit unserer Hemmungszone zu vergleichen.

Die elektrische Ladung der Blutkörperchen in der Hemmungszone.

Ihre Bestimmung geschah mit Hilfe der handlichen Einrichtung von *Michaelis* an 1 proz. Aufschwemmungen in isotonischer $CaCl_2$-Lösung mit Acetatgemischen 1b. Es zeigte sich, daß die Blutkörperchen der Hemmungszone zur Kathode wanderten, also positive Ladung hatten. Wurde der Kataphoreseversuch gleich nach Ansatz der Mischungen angestellt, so waren die Blutkörperchen am linken Ende der erst nach einiger Zeit deutlich werdenden Hemmungszone isoelektrisch oder selbst noch anodisch. Der Zeitfaktor der Umladung (*Kozawa*) trat hier deutlich hervor.

Es wurde ferner versucht, die Ladungsverhältnisse der Blutkörperchen auch durch Capillarisation mit Fließpapier festzustellen. Nach bekannten Analogien war zu erwarten, daß positive Blutkörperchen von der sich negativ ladenden Papierfaser festgehalten, negative dagegen vom Capillarstrom der Suspensionsflüssigkeit mitgenommen würden. Versuche mit Aluminiumchlorid bewiesen denn auch die Brauchbarkeit der Methode. 50 proz. Normalblut in NaCl ergab beim Auftropfen auf Fließpapier einen Ausbreitungskreis von 19 mm Durchmesser, wogegen 50 proz. Blut mit $^n/_{100}$-$AlCl_3$ einen Tropfen von 8 mm Durchmesser ergab, um den sich die Suspensionsflüssigkeit mit breiter farbloser Zone

ausbreitete. Bei Anwendung von Lanthan ist der Effekt am deutlichsten, doch ist er hier nicht allein auf die elektrische Ladung, sondern auch, und wohl in der Hauptsache, auf die Agglutination der Blutkörperchen zu beziehen, denn es ist bekannt, daß agglutinierte Blutkörperchen nicht durch Filter laufen, wohl einfach deshalb, weil die Komplexe zu groß sind, die Poren zu passieren. Beim $AlCl_3$ trat der Effekt aber auch bei nichtagglutinierenden Konzentrationen auf, desgleichen bei der gleich zu besprechenden Säurewirkung, bei der es überhaupt nicht zur Agglutination kam.

Wurde aus einem Ca-Versuche in Acetatgemischen mit 5 proz. Aufschwemmung aus jedem Röhrchen je ein Tropfen auf Filtrierpapier gebracht, so ergaben die Blutkörperchen der Hemmungszone (von p_H 4,4 abwärts) scharf begrenzte Kreise, die Blutkörperchen jenseits des gelösten Röhrchens in der Mitte, also von p_H 5 aufwärts größere verwaschene Flecken. Somit tragen die Blutkörperchen über p_H 4,7 die gleiche Ladung wie die Papierfaser, nämlich negative, die darunter, d. i. in der Hemmungszone, positive. Mit dieser Methode war der Zeitfaktor der Umladung besonders leicht zu verfolgen. — Die Blutkörperchen der Hemmungszone zeigen also ausgesprochen *positive Ladung*[1]) und damit war die Deutung der Gerinnung im Inneren der Blutkörperchen zum mindesten sehr erschwert. Wir lenkten nun unsere Aufmerksamkeit auf die

Säureflockung der Stromasubstanz.

Die Angaben der Literatur über den isoelektrischen Punkt der Stromasubstanz gehen auseinander. *Michaelis* und *Takahashi* fanden mit Acetatgemischen in Blut, das mit destilliertem Wasser gelöst war, das Optimum bei p_H 5. *Landsteiner* fand gleichfalls mit Acetatgemischen an wärmegelöstem Blut Flockung von p_H 4,3 abwärts. *Kozawa* bestimmte kataphoretisch den Umkehrpunkt der intakten Blutkörperchen in isotonischer Phosphatlösung zu p_H 2,7 und *Coulter* nach einfachem Zusatze von HCl bei p_H 4,6. *Jodlbauer* und *Haffner* fanden das Flockungsoptimum in phosphathaltiger NaCl-Lösung nach vorgängiger Wärmehämolyse bei p_H 3. *Michaelis* und *Takahashi* sowie *Jodlbauer* und *Haffner* sahen in dem von ihnen bestimmten Flockungsoptimum des Stromas auch die Hämolyse erfolgen. Bei *Kozawa* differieren die Werte etwas.

---

[1]) Die kathodische Wanderung der Blutkörperchen in der Hemmungszone war sehr energisch, so daß auf beträchtliche Intensität der Ladung geschlossen werden darf. Damit würde auch ihre langsame Senkung (Anm. beim Versuche S. 547) im Sinne des Zusammenhanges von elektrischer Ladung und Senkungsgeschwindigkeit (*Linzenmeier*) erklärt sein.

Anläßlich des Versuches die fixierten Säure-Ca-Blutkörperchen in größerer Menge zu gewinnen, zu welchem Zwecke die 100fachen Mengen des 7ten Röhrchens unseres Versuches auf S. 547 gemischt wurden, unterblieb die Sedimentierung auch bei mehrtägigem Stehen. Warum dies bei Verwendung absolut größerer, relativ aber gleicher Mengen eintrat, konnte nicht ermittelt werden; wir sind der Meinung, daß hier die Blutkörperchensuspension durch elektrische Kräfte völlig stabilisiert wurde.

Da es wahrscheinlich war, daß die abweichenden Resultate in der abweichenden Methodik ihren Grund hatten, namentlich in der Verwendung verschiedener Regulatoren, worauf schon *Jodlbauer* und *Haffner* aufmerksam gemacht hatten, und wofür die von *Rona* und *Michaelis* sowie *Michaelis* und *György* nachgewiesene Verschiebung des isoelektrischen Punktes durch Elektrolyte eine Grundlage abgaben, haben wir planmäßig verschiedene Regulatoren geprüft. Wir setzten sie zu Blut, das in destilliertem Wasser gelöst war, zu und untersuchten ferner noch den Einfluß von NaCl, KCl, $CaCl_2$ auf die Flockung, da einerseits sich am intakten Blutkörperchen die Stromasubstanz im Medium ihrer Binnenelektrolyte befinden, andererseits das Ca gerade für unsere Versuche von Wichtigkeit war. Das Ergebnis dieser Versuche war folgendes:

Die Stromasubstanz der durch destilliertes Wasser gelösten Blutkörperchen zeigten unter sonst gleichen Bedingungen ihr Flockungsoptimum

in Acetatgemischen bei p_H 5 (1c),
in Lactatgemischen bei p_H 4,9 (2b),
in Phosphatgemischen bei p_H 3,2 (3).

und zwar erfolgt die Flockung in allen Gemischen in Form farbloser Flöckchen, wie dies von *Michaelis* und *Takahashi* beim Acetat beschrieben wurde.

Es zeigt sich also, daß das Flockungsoptimum in verschiedenen Regulatoren ein verschiedenes ist und daß unsere Werte recht gut mit denen der Autoren übereinstimmen, wenn man die Art der angewandten Regulatoren berücksichtigt.

Veränderung der Konzentration der Puffersalze (als Beispiel Prot. 3) änderte nichts an der Lage des Optimums, doch verbreiterte sich bei niedrigeren Konzentrationen die Flockungszone ins weniger saure Gebiet. NaCl, KCl und $CaCl_2$ hemmten, ohne die Lage des Optimums zu verschieben, die Flockung weitgehend. Sie war in $^n/_{10}$-NaCl und $^n/_{10}$-KCl sowie $^n/_{100}$-$CaCl_2$ bereits völlig unterdrückt. Dieser Einfluß der Salze auf die Stromaflockung entspricht dem Einfluß der Salze auf die Flockung von denaturiertem Serumalbumin und Casein in den Versuchen von *Rona* und *Michaelis* sowie *Michaelis* und *György*.

Wir haben auch mit Lactat und Phosphatgemischen die Hämolyseversuche unter Ca-Zusatz ausgeführt und wieder die unregelmäßige Reihe erhalten. Im Lactat 2a trat die erste Lösung bei p_H 4,3, die Hemmungszone zwischen 3,9 und 3,3 auf. Im Phosphat war die Reihe ins saurere Gebiet verschoben und zwar um den gleichen Betrag, um den die Stromaflockung verschoben war. Sowohl im Lactat wie im Phosphatpuffer zeigten die Blutkörperchen der Hemmungszone ausgesprochen kathodische Wanderung.

Das wichtigste Ergebnis dieser Säureflockungsversuche für unsere Frage aber ist: *Die Hemmungszone deckt sich nicht mit dem Fällungsoptimum der Stromasubstanz im wassergelösten Blute, sondern beginnt etwa 0,3—0,6 p_H unter diesem.*

Nun erhebt sich aber die Frage, ob jene aus wassergelöstem Blute bei bestimmter H-Ionenkonzentration flockende Substanz die Gesamtheit der Stromabestandteile darstellt oder nur einen Teil und ob sie allein für das Zustandekommen des Säurefällungsvorganges im Gesamtblutkörperchen in Betracht kommt. Mikroskopisch erweist sich die Flockung als feinkörniger Niederschlag und dürfte nach der Lage seiner isoelektrischen Konstante sowie seiner Unlöslichkeit in Alkohol und Äther zu schließen, das Stromaeiweiß darstellen, das offenbar durch Zerfall der Blutschatten frei wird; diese zerfallen nämlich, wie schon *Wooldridge* hervorhebt, unter Säureeinwirkung. Das Gesamtblutkörperchen enthält aber außer dem Stromaeiweiß noch Lipoide und den Farbstoff und es müssen natürlich auch die isoelektrischen Konstanten dieser Stoffe berücksichtigt werden. Wir lassen zunächst unsere Feststellungen über Säureflockung von Lipoiden und Farbstoff folgen.

Die Säureflockung der Lipoide.

Das Fällungsoptimum von Lecithinpräparaten liegt nach *Feinschmidt* sowie *Michaelis* in Acetat bezw. Lactatgemischen bei p_H 2,9 und darunter; von Lipoiden aus Hammelblutkörperchen bei p_H 2 bezw, p_H 1,7.

Wir konnten das Fällungsoptimum von Alkohol-Ätherextrakten aus gewaschenen und getrockneten Rinderblutkörperchen in Lactatgemischen deutlichst bei p_H 2 feststellen 2c. In unseren Acetatgemischen, die nur bis p_H 3,2 reichten, erhielten wir keine Lipoidflockung, desgleichen auch nicht mit den Phosphatgemischen.

Die Säureflockung des Farbstoffes.

Das unveränderte Hämoglobin flockt nach *Michaelis* und *Takahashi* im isoelektrischen Punkte nicht aus und da dieser überdies bei p_H 6,77 liegt, kommt das unzersetzte Hämoglobin für uns nicht in Frage. Dagegen flockt nach den genannten Autoren das unter Säureeinwirkung entstehende braune Zersetzungsprodukt und zwar ziemlich weit im sauren Gebiete. Wir konnten den Beginn dieser Flockung mit Acetat- und Lactatgemischen bei etwa p_H 3,5 feststellen 1c (s. Tabelle).

In der Tabelle sind unter Zugrundelegung der Versuche mit den Lactat- und Acetatgemischen die Ergebnisse unserer Versuche über Säurehämolyse in Ca-Gegenwart sowie über die Säureflockung der Blutkörperchenbestandteile zusammengestellt. Es zeigt sich folgendes: *Die isoelektrischen Punkte der einzelnen Blutkörperchenbestandteile liegen weit auseinander und fassen unsere Hemmungszone zwischen sich.* Daraus ergibt sich die

Übersicht der Versuche.

p_H	5,9	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1	3,8	3,5	3,2	2,9	2,6	2,3	2	1,7	1,4
				Optimum der Stromaeiweißfällung	erste Lösungszone*)		Hemmungszone				zweite Lösung			Optimum der Lipoidfällung		
									Fällung des zersetzten Farbstoffes							

*) In den zahlreichen mit den gleichen Regulatoren angestellten **Parallelversuchen** über Stromaflockung und Hämolyse, letztere in reiner $CaCl_2$-Lösung, $CaCl_2$-haltiger sowie reiner NaCl-Lösung, trat ausnahmslos völlige Lösung erst etwa 0,3 p_H weiter im sauren Gebiete auf als das Flockungsoptimum der Stromasubstanz gefunden wurde. Auch bei Versuchen mit HCl sowie mit Essigsäure lag die Hämolysegrenze stets bei höheren Säuremengen wie die Flockung. In unseren Versuchen fiel also Lyse und Flockung nicht so vollkommen zusammen wie in den Versuchen von *Michaelis* und *Takahashi* sowie *Jodlbauer* und *Haffner*.

Möglichkeit einer Erklärung der Hemmungszone.

Betrachten wir zunächst nur Stromaeiweiß und Lipoid, so ergibt sich, daß zwischen p_H 5 und p_H 2 das Stromaeiweiß positive, das Lipoid aber noch negative Ladung besitzen muß und daß damit die Bedingung gegenseitiger Ausfällung gegeben sein muß. Denn nach *Michaelis* und *Davidsohn* flockt ein Gemisch von 2 amphoteren Kolloiden mit verschiedenen isoelektrischen Punkten bei jener H-Ionenkonzentration, bei der das eine Kolloid schon genügend positiv, das andere noch genügend negativ ist. Für das Farbstoffzersetzungsprodukt gilt das gleiche, doch wird das nähere erst bei Besprechung des Ca-Einflusses erörtert werden.

Die Lage unserer Hemmungszone näher gegen das Fällungsoptimum des Stromas zu erklärt sich ebenfalls aus der Untersuchung der letztgenannten Autoren, indem sich nämlich herausstellte, daß, wenn eine Komponente im Überschuß vorhanden ist, sich der Flockungspunkt des Gemisches gegen den isoelektrischen Punkt des überschüssigen Kolloids verschiebt. Im Blutkörperchen überwiegt nun das Eiweiß über das Lipoid (*Pascucci*).

Einer Erörterung bedarf noch der Umstand, daß in der ausgebildeten Hemmungszone die Blutkörperchen stets kathodisch wanderten: Wenn man aber annimmt, daß sich die Gesamtladung additiv aus der Ladung der Komponenten zusammensetzt, so muß bei Überwiegen der Eiweiß-

komponente schließlich deren positive Ladung für die Wanderungsrichtung der Blutkörperchen ausschlaggebend sein. Auch ist daran zu denken, daß die schließlich positive Ladung erst nachträglich zustande gekommen sein könnte (Zeitfaktor der Umladung!) und daß im Momente der Ausflockung im Inneren der Blutkörperchen tatsächlich isoelektrisches Verhalten bestanden hat.

Verschiebung des Fällungsoptimums der Stromasubstanz durch Lipoide.

War unsere Deutung der Gerinnung in den Blutkörperchen als Fällungsoptimum eines Gemisches zweier amphoterer Kolloide mit verschiedenen isoelektrischen Punkten richtig, dann mußte bei Stromaeiweißfällungsversuchen Zusatz von Lipoiden die Fällungszone nach rechts gegen den isoelektrischen Punkt des Lipoids zu verschieben, ebenso wie in den Versuchen von *Feinschmidt* Zusatz von Eiweiß die Fällung des Lecithins nach links verbreiterte. Das war sowohl bei Anwendung von Blutkörperchenlipoiden sowie auch von Lecithin Merck der Fall 2d. Dabei wurde nicht nur das Optimum verlagert, sondern die Flockung wurde auch massiger und ihre Zone verbreiterte sich wie in den Lecithin-Eiweißversuchen von *Feinschmidt.*

Es war aber auffallend, daß hierzu nicht unbeträchtliche Lipoidmengen nötig waren, wenigstens im Vergleiche zum normalen Lipoidgehalt der Blutkörperchen, und es muß deshalb die Annahme gemacht werden, daß am intakten Blutkörperchen die Fällungsbedingungen günstiger sind wie am gelösten Blut, wobei wohl den räumlichen Beziehungen von Eiweiß und Lipoid sowie ihrem physiologischen Mischungszustande eine Rolle zukommen dürfte. Bei der Auflösung des Blutes mit Wasser kommt es nach *Bechhold* zu einer Entmischung von Lipoid und Eiweiß, wobei das Lipoid das Blutkörperchen verläßt.

Die Rolle des Calciums.

Wir haben weiter oben festgestellt, daß bei der auffälligen und durch das Auftreten einer Hemmungszone so charakteristischen Abänderung des Verlaufes der Säurehämolyse in Ca-haltiger Lösung nur die Verstärkung eines auch ohne Ca sich abspielenden Vorganges, nämlich einer Gerinnung im Inneren der Blutkörperchen vorliegt. Den Mechanismus dieser Gerinnung haben wir eben im Prinzip aufzuklären versucht und es bleibt noch der Ca-Einfluß zu erörtern übrig. Unseres Erachtens ist dies unter Zugrundelegung der so vielfach hervortretenden kolloidverfestigenden, die Zellen „dichtenden“ Wirkung des Ca, die sich in den bereits bekannt gewordenen Fällen von Hämolysebeeinflussung durch Ca (*Höber*) kundgibt und die in unseren Versuchen auch in der Abschwächung der ersten vor der Hemmungszone gelegenen Lösung zum Ausdruck kommt, möglich und zwar unter Beachtung zeitlicher

Umstände. Verhindert nämlich das Ca den Austritt des Hämoglobins solange bis die erörterten Bedingungen der Kolloidfällung eingetreten sind und die Umladung und Fällung im Inneren der Blutkörperchen erfolgt, wozu eine gewisse Zeit nötig ist, dann beteiligt sich auch der Farbstoff am Fällungsvorgange und zwar wird er ihn verstärken und ausgiebiger machen, da er ebenfalls eine niedrigere isoelektrische Konstante besitzt wie das Stromaeiweiß. Da der Farbstoff mitgefällt wird, wird er in den Blutkörperchen festgehalten; diese können sich nun aus farbloser Lösung absetzen und so entsteht die Hemmungszone.

Es wurde oben mitgeteilt, daß das Ca schon in relativ niedrigen Konzentrationen die Flockung von Stromasubstanzen und Farbstoff hemmt. Wenn nun trotzdem im Blutkörperchen Säurefällung zustande kommt, so würde dies der vielfach vertretenen Anschauung entsprechen, daß das Ca nicht in die Blutkörperchen einzudringen vermag[1]). Man hat sich offenbar vorzustellen, daß das Ca die Grenzschicht der Blutkörperchen derart verändert, daß der Austritt des Hämoglobins erschwert ist, ebenso wie das Ca nach *Lillie* den Austritt des Farbstoffes aus Arbaciaeiern bei Einwirkung von Alkali sowie nach *Hansteen-Cranner* den Austritt von Lipoiden aus Pflanzenzellen verhindert. Der Eintritt der Säure scheint dagegen nicht beeinflußt zu sein, denn die Verfärbung durch Hämatinbildung erfolgt mit und ohne Ca am gleichen Punkt; dies erscheint auch verständlich, denn die H-Ionen dringen nicht einfach ein, sondern reagieren mit dem Substrat.

Weitere Fälle von dichtender Ca-Wirkung auf Zellen sind von *Wiechmann* im Anschlusse an seine Beobachtung über Hemmung des Eindringens von Brom-Anionen in rote Blutkörperchen durch Ca zusammengestellt worden. Auch die Angabe *Deetjens*, daß das Ca schon in geringer Menge den quellenden und zerstörenden Einfluß des destillierten Wassers auf Zelltrockenpräparate zu beheben vermag, gehört hierher.

Nach unserer oben entwickelten Auffassung war also die Wirkung des Ca eine mittelbare und es ergab sich nun die Frage, wieweit das Ca in seiner Beeinflussung der Säurehämolyse durch andere Ionen vertretbar sei. Lithium und Kalium wirkten wie Natrium, d. h. die Säurehämolyse verlief hier wie in Kochsalzlösung; von den zweiwertigen Ionen riefen Strontium, Magnesium und Barium die Hemmungszone ebenso hervor wie Calcium, dagegen waren Cadmium, Mangan, Nickel und Kobalt wirkungslos. Somit erscheinen die Salze der Erdalkalien bevorzugt, was insofern auffällt als nach den von *Höber* zusammengestellten Gesetzmäßigkeiten für cytolytische Prozesse, wie sie ja unsere Hämolyseversuche darstellen, eine Vertretbarkeit des Calciums durch beliebige zweiwertige Ionen zu erwarten gewesen war.

[1]) Allerdings steht dieser Anschauung die Angabe von *Hamburger* über Permeabilität der Blutkörperchen für Ca entgegen.

Protokolle.

Die Acetat- und Laktatgemische sind nach dem Prinzip der H-Reihe mit Salzkonstanz (*Michaelis*) hergestellt.

1. Versuche mit Acetatgemischen.

a) Hämolyse in $CaCl_2$, b) Kataphoreseversuche, c) Stromafällung.

	p_H	5,9	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1	3,8	3,5	3,2
	n/10 Na-Acetat	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Essigsäure n/100	0,62	1,25	—	—	—	—	—	—	—	—
	Essigsäure n/10	—	—	0,25	0,5	1	2	4	8	—	—
	Essigsäure n/1	—	—	—	—	—	—	—	—	1,6	3,2
	dest. Wasser	8,38	7,75	8,75	8,5	8	7	5	1	7,4	6,8
a)	je 5 ccm des Gemisches + 5 ccm 5,4% $CaCl_2$ + 1 ccm 10% Blutkörperchenaufschwemmung.										
	n. 12h Lösung	—	—	—	+	+++	+	—	—	±	++
b)	n. 12h Kataphor.	anod.	0	0	0	—	kat.	kat.	kat.	kat.	—
c)	je 5 ccm des Gemisches + 1 ccm in dest. Wasser gelöstes Blut (10%)										
	10′	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
	20′	—	—	—	+	+	—	—	—	—	×
	30′	—	—	+	++	+	+	—	—	×	××
	2h	—	—	+	+++	++	++	+	×	××	×××

+ Flockung des Stromaeiweißes.
× Flockung des Hämoglobinzersetzungsproduktes.

2. Versuche mit Laktatgemischen.

a) Hämolyse in $CaCl_2$, b) Flockung des Stomaeiweißes, c) Lipoidflockung, d) Verschiebung der Flockung in Stroma-Lipoidgemischen.

	p_H	4,9	4,6	4,3	3,9	3,6	3,3	2,9	2,6	2,3	2	1,7	1,4
	n/40 Na laktat	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Milchsäure m/100	0,49	0,98	1,95	3,9	7,8							
	Milchsäure m/10						1,56	3,12	6,28				
	Milchsäure m/1									1,25	2,5	5	10
	dest. Wasser	9,51	9,02	8,05	6,1	1,2	8,44	6,88	3,72	8,75	7,5	5	0
a)	je 5 ccm des Gemisches + 5 ccm 5,4% $CaCl_2$ + 1 ccm 10% Blutkörperchenaufschwemmung.												
	Lösung	—	—	+++	—	—	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++
b)	je 5 ccm des Gemisches + 1 ccm in dest. Wasser gelöstes Blut (10%).												
	5′	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	30′	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×
	1h	++	+	+	—	—	—	—	—	—	××	××	××
	2h	+++	+++	++	+	+	—	×	××	×××	×××	××	×××
c)	je 5 ccm des Gemisches + 1 ccm einer leicht spalescierenden Lösung von Blutkörperschen Lipoiden.												
	1h	—	—	—	—	—	—	±	+	++	+++	++	++
d)	je 5 ccm des Gemisches + 1 ccm gelöstes Blut und Lipoide, zu gleichen Teilen gemischt.												
	20′	++	+++	+++	++	+	+	—	—	—	—	—	—

8. Versuche mit Phosphatgemischen.

Stromafällung bei Anwendung des Regulators in verschiedener Konzentration. p_H mit Indicatoren bestimmt.

Verdünnung	p_H					3,2			
	m/3 prim. Phosphat	50	49,5	49	48	47	46	45	44
	m/3 Phosphorsäure	—	0,5	1	2	3	4	5	5
	die folgenden Verdünnungen dieses Regulators zu 2% mit gelöstem Blut versetzt								
	10′	—	—	—	—	+	+	—	—
1:10 ca. m/30	30′	—	—	—	+	++	++	+	—
	3h	—	—	—	++	+++	+++	++	—
	30′	—	—	—	+	+	—	—	—
1:20 = ca. m/60	1h	—	+	+	++	+++	+	—	—
	3h	—	+	++	+++	+++	+++	++	+
	30′	—	—	—	+	+	—	—	—
1:50 ca. m/150	1h	—	+	+	++	++	++	++	—
	3h	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+

Zusammenfassung.

Bei Säurehämolyseversuchen mit steigenden Säuremengen bildet sich in Ca-haltiger Lösung, nachdem es bei bestimmten Säurekonzentrationen zur Hämolyse gekommen ist, bei nächsthöheren Säuremengen eine Hemmungszone, in der sich braun gefärbte Blutkörperchen aus farbloser Lösung absetzen. Diese Blutkörperchen lösen sich unter Einwirkung von Hämolyticis nicht auf, erscheinen also fixiert, und zeigen ultramikroskopisch Gerinnung ihres Inneren. Als Ursache dieser Gerinnung kommt Säurefällung in Betracht, u. zwar der Umstand, daß die verschiedenen Bestandteile der Blutkörperchen Stromaeiweiß, Lipoide und das Säurezersetzungsprodukt des Hämoglobins zum Teil weit auseinanderliegende isoelektrische Konstanten besitzen und deshalb bei bestimmter H-Ionenkonzentration verschiedene Ladung annehmen und sich gegenseitig ausfällen. Die Gerinnung der Blutkörperchensubstanzen unter Säureeinfluß ist in geringem Grade auch in Ca-freier Lösung nachweisbar; anwesendes Ca verstärkt jedoch den Vorgang, indem es den vorzeitigen Austritt des Hämoglobins verhindert und dadurch bewirkt, daß der Farbstoff im Inneren der Blutkörperchen an der Fällung teilnimmt. — In dieser Wirkung ist das Calcium nur durch Strontium, Barium und Magnesium vertretbar.

Der isoelektrische Punkt des Stromaeiweißes sowie der intakten Blutkörperchen wird bei Anwendung verschiedener Regulatoren an verschiedener Stelle gefunden und dadurch erklären sich die widersprechenden Angaben der Literatur. Fällungsoptimum der Stromasubstanz im gelösten Blut sowie kataphoretischer Umkehrpunkt der intakten Blutkörperchen fand sich in Acetat- und Lactatgemischen bei etwa p_H 5, in Phosphatgemischen bei etwa p_H 3,2.

Die elektrische Ladung der Blutkörperchen läßt sich durch Capillarisation feststellen. Anodisches Blut breitet sich auf Filtrierpapier getropft aus, kathodisches haftet an der Faser.

Literatur.

Bechhold, Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 5, S. 127. — *Bechhold* und *Kraus*, diese Zeitschr. **109**, 226. 1920. — *C. B. Coulter*. Jorn. of. gen. Phys. **3**, 309, 1921. — *Deetjen*, Berl. klin. Wochencshr. 1904, Nr. 164. — *Feinschmidt*, diese Zeitschr. **38**, 244. 1912. — *Hamburger*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **69**, 663. 1909. — *Hansteen-Cranner*, Ber. d. botan. Ges. **37**, 385. 1919. — *Höber*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **513**, 166. 1917; **182**, 104. 1920. — *Jodlbauer* und *Haffner*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **179**, 121. 1920. — *Kozawa*, diese Zeitschr. **60**, 146. 1914. — *Landsteiner*, diese Zeitschr. **50**, 176. 1913. — *Loeb*, diese Zeitschr. **47**, 127. 1912. — *Meves*, Anat. Anzeigen **25**, 240, 1904. — *Michaelis*, Prakticum der physikalischen Chemie, 1921. — *Michaelis* und *Davidsohn*, diese Zeitschr. **39**, 490. 1912. — *Michaelis* und *György*, diese Zeitschr. **103**, 178. 1921. — *Michaelis* und *Rona*, diese Zeitschr. **94**, 225. 1919. — *Michaelis* und *Takahashi*, diese Zeitschr. **29**, 439. 1910. — *Pascucci*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **6**, 543. 1905. — *Rohonyi*, Kolloidchem. Beih. **8**, 337, 391. — *Schaffer*, Lehrbuch d. Histologie 1922. — *Wiechmann*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **189**, 109. 1921. — *Wooldridge*, Arch. f. Anat. u. Physiol., Phys. Abt. 1881, S. 387.

Über Hämolyse durch Morphin und seine Homologen.

Von

Heinrich Rhode.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 5. Mai 1922.)

Bei Gelegenheit früherer Untersuchungen[1]) wurde gefunden, daß Kodeinphosphat in isotonischer Konzentration keine, Morphinchlorid und Dionin dagegen starke Hämolyse bewirkten. Diese Beobachtung gab Anlaß zu einer systematischen Prüfung verschiedener Salze des Morphins und seiner Verwandten, die auf Bitte des Pharmakologischen Institutes von der Firma F. Merck, Darmstadt, in bekannter ausgezeichneter Beschaffenheit geliefert wurden[2]). Es waren die folgenden mit der von der Firma angegebenen Zusammensetzung:

Morphinum hydrochloricum $C_{17}H_{19}NO_3HCl + 3\ H_2O$ Mol.-Gew. 321,5 + 54
„ hydrobromicum $C_{17}H_{19}NO_3HBr + 2\ H_2O$ 366 + 36
„ sulfuricum $(C_{17}H_{19}NO_3)_2H_2SO_4 + 5\ H_2O$ 2 · 334 + 90
Methylmorphinum (Codeinum) hydrochloricum $C_{18}H_{21}NO_3HCl + 2\ H_2O$ Mol.-Gew. 335,5 + 36
Methylmorphinum hydrobromic. $C_{18}H_{21}NO_3HBr + 2\ H_2O$ Mol.-Gew. 380 + 36
„ sulfuricum $(C_{18}H_{21}NO_3)_2H_2SO_4 + 5\ H_2O$ 2 · 348 + 90
Äthylmorphinum hydrochloricum (Dionin) $C_{19}H_{23}NO_3HCl + 2\ H_2O$ Mol.-Gew. 349,5 + 36
Benzylmorphinum hydrochloricum (Peronin) $C_{24}H_{25}NO_3HCl$ Mol.-Gew. 411,5.

Durch die Ausgangsbeobachtungen und daran anknüpfende selbstverständliche Überlegungen war als Aufgabe der Versuche vorgezeichnet, den Anteil der Alkaloide und der mit ihnen verbundenen Anionen möglichst gegeneinander abzugrenzen. Deswegen wurden Lösungen der verschiedenen Salze in wechselnden Konzentrationen mit Blutkörperchen zusammengebracht, die in Lösungen von Kochsalz (0,9 proz.), Natriumsulfat (1,4 proz.), Rohrzucker (8,5 proz.), Dextrose oder Mannit (je 5,4 proz.) aufgeschwemmt waren. Da sich prinzipielle Analogien zu den älteren Befunden zeigten, die *Grijns*[3]) und *Hedin*[4]) an Ammoniumsalzen erhoben hatten, so wurden vergleichsweise auch solche herangezogen.

Methodisches.

Stets Schweineblut; stets 3 mal auf der Zentrifuge mit Waschflüssigkeit gewaschen, mehrfach dasselbe Blut parallel mit Kochsalz- und Rohrzuckerlösung. Aufschwemmung des Blutkörperchenbreis auf das 10 fache Volumen; davon je

[1]) *H. Rhode*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **91**, 173, 186. 1921.
[2]) Der Firma sei für ihre wertvolle Unterstützung aufrichtiger Dank gesagt.
[3]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **63**, 86. 1896.
[4]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **68**, 229. 1897; **70**, 525. 1898.

0,5 ccm zu 5 ccm der zu prüfenden Lösungen. Sämtliche Lösungen waren neutral, wie durch die Indicatorenmethode von *Sörensen* kontrolliert wurde. Vielfach wurde mit übersättigten Lösungen gearbeitet und die Ergebnisse verzeichnet, so lange nichts auskrystallisiert war. Stets Zimmertemperatur (Sommer).

Die isotonische Konzentration der angewandten Alkaloidsalze würde bei vollständiger Dissoziation zwischen 5,7 und 6,4% für die Halogenide, zwischen 7,8 und 8,1% für die Sulfate liegen. Da die exakte Feststellung des Dissoziationsgrades besondere zeitraubende Untersuchungen erfordert hätte, geringfügige Abweichungen der osmotischen Konzentration aber bekanntlich für die Hämolyse bedeutungslos sind, so wurde durchweg bis herab zu etwa 6% als Lösungsmittel Wasser benutzt, geringere Konzentrationen durch Zusatz von Kochsalz oder Rohrzucker ausgeglichen (in den Tabellen ist der Einfachheit halber stets „Lösungsmittel" geschrieben, was im strengen Wortsinne nicht zutrifft).

Die erhaltenen Ergebnisse finden sich auf den Tabellen I—V zusammengestellt, in denen der Hämolysegrad durch Zahlen ausgedrückt wurde; von diesen bedeutet:

0 keine Hämolyse,
I Beginn der Hämolyse eben erkennbar,
II deutliche, doch mäßige Hämolyse,
III starke, doch nicht vollständige Hämolyse,
V vollkommen klare Lösung.

Alle Versuche einer Tabelle wurden an demselben Blute ausgeführt.

Die ersten Versuche bringen nur quantitative Feststellungen über den Hämolysegrad der verschiedenen Salze (vgl. Tabelle I u. II).

Tabelle I.

Blutkörperchen mit Kochsalzlösung gewaschen.

Substanz	Lösungsmittel	%	Nach Stunden 2	4	19	24
Morphinsulfat	Wasser	10	0	0	II	II
	"	7	0	II	II	II
	Kochsalz	4	0	0	II	II
	Zucker	4	0	0	0	0
Morphinbromid	Wasser	6,5	0	I	II	III
	Kochsalz	4	0	0	II	III
	"	3	0	0	0	0
	Zucker	4	0	0	0	0
Morphinchlorid	Wasser	10	V	—	—	—
	"	8	V	—	—	—
	"	5,7	II	V	—	—
	Kochsalz	4	0	I	III	III
	"	3	0	0	0	I
	"	2	0	0	0	0
	Zucker	4	0	0	0	0
Dionin	Wasser	10	0	III	V	—
	"	8	0	III	V	—
	"	6	II	III	V	—
	Kochsalz	4	0	III	V	—
	"	3	0	III	V	—
	"	2	0	0	I	I
	"	1	0	0	0	0
	Zucker	4	0	0	0	0

Substanz	Lösungsmittel	%	Nach Stunden 2	4	19	24
Kodeinsulfat	Kochsalz	4	0	I	II	II
	"	3	0	0	0	0
	"	2	0	0	0	0
	Zucker	4	0	0	0	0
Kodeinbromid	Kochsalz	4	0	I	II	II
	"	3	0	0	0	0
	"	2	0	0	0	0
	Zucker	4	0	0	0	0
Kodeinchlorid	Wasser	8	II	III	V	—
	"	6	III	V	—	—
	Kochsalz	4	0	II	III	III
	"	3	0	0	0	0
	"	2	0	0	0	0
	Zucker	4	0	0	0	0
Peronin	Kochsalz	2	V	—	—	—
	"	1	V	—	—	—
	"	0,5	III	V	—	—
	"	0,25	0	0	I	II
	Zucker	1	0	0	0	0

Tabelle II.

Blutkörperchen mit Rohrzuckerlösung gewaschen.

Substanz	Lösungsmittel	%	Nach Stunden 4	24	48	Substanz	Lösungsmittel	%	Nach Stunden 4	24	48
Morphinsulfat	Wasser	10	0	0	0	Kodeinsulfat	Wasser	10	0	0	0
	"	6,5	0	0	0		"	8	0	0	0
	Zucker	4	0	0	0		"	6	0	0	0
	"	3	0	0	0		Zucker	4	0	0	0
Morphinbromid	Wasser	10	I	I	I		"	3	0	0	0
	"	6,5	0	0	0	Kodeinbromid	Wasser	10	I	I	II
	Zucker	4	0	0	0		"	7,5	I	I	I
	"	3	0	0	0		Zucker	4	0	0	0
Morphinchlorid	Wasser	10	II	II	III		"	3	0	0	0
	"	8	II	II	III	Kodeinchlorid	Wasser	10	I	I	I
	"	5,7	III	III	III		"	8	0	0	0
	Zucker	4	0	0	0		"	6	0	0	0
	"	3	0	0	0		Zucker	4	0	0	0
Dionin	Wasser	10	0	0	0		"	3	0	0	0
	"	8	0	0	0	Peronin	Wasser	7,5	V	—	—
	"	6	0	0	0		Zucker	2	0	V	—
	Zucker	4	0	0	0		"	1	0	0	—
	"	3	0	0	0		"	0,5	0	0	—

Die Betrachtung der Tabellen I und II lehrt im wesentlichen folgendes: Morphin und Codein wirken etwa gleichstark hämolytisch; die Wirkung ihrer Sulfate und Bromide ist deutlich schwächer als die der Chloride; Äthylmorphin wirkt stärker, Benzylmorphin beträchtlich stärker als die niederen Homologen. Alle beobachteten Wirkungen werden durch die Gegenwart von Chlorid, selbst in kleinen Mengen, außerordentlich begünstigt.

Es schien zunächst erwünscht, den Einfluß des anorganischen Elektrolyten zahlenmäßig noch genauer abzugrenzen. Dies geschah durch Versuche in Mischungen von Kochsalz- und Rohrzuckerlösungen und zwar vergleichsweise in 2 Reihen: Mit Suspensionen von Blutkörperchen, die demselben Blute entstammten, jedoch einerseits mit Kochsalzlösung, andererseits mit Rohrzuckerlösung gewaschen waren. Die Konzentration der Alkaloidsalze in der Suspensionsflüssigkeit betrug fast in allen Versuchen 4%, nur bei dem stark wirksamen Peronin 0,5% (Tabelle III).

Die Zahlen der Tabelle III stimmen im Prinzip völlig mit denen der Tabellen I und II überein und bestätigen somit den merkwürdigen Befund, daß zwar die hämolytische Wirkung aller untersuchten homologen Alkaloide durch die Gegenwart von Chlorionen gesteigert wird, aber doch in sehr verschiedenem Maße: Bei den Chloriden des Morphins, Kodeins und Benzylmorphins läßt sich eine verständliche Gesetz-

Tabelle III.

Substanz	Suspensionsflüssigkeit enthält ccm isotonischer Lösung von Rohrzucker	Kochsalz	Cl:Mol	Blutkörperchen gewaschen mit Rohrzucker nach Stunden 1	5	14	24	Kochsalz nach Stunden 1	5	14	24
Morphinsulfat 4%	5	0	0	—	—	—	0	—	—	—	0
	4	1	0,03	—	—	—	0	—	—	—	0
	3	2	0,06	—	—	—	0	—	—	—	0
	2	3	0,09	—	—	—	0	—	—	—	0
	1	4	0,12	—	—	—	0	—	0	I	II
	0	5	0,15	—	—	—	0	—	0	II	III
Morphinchlorid 4%	5	0	0,11	—	0	I	I	—	0	I	I
	4	1	0,14	—	0	I	I	—	0	I	I
	3	2	0,17	—	0	I	I	—	0	I	I
	2	3	0,20	—	0	I	I	—	0	I	I
	1	4	0,23	—	0	I	I	—	0	II	II
	0	5	0,26	—	0	I	I	—	0	II	III
Kodeinchlorid 4%	5	0	0,11	—	—	0	I	—	—	—	—
	4	1	0,14	—	—	0	I	—	—	—	—
	3	2	0,17	—	—	0	I	—	—	—	—
	2	3	0,20	—	—	0	I	—	0	II	II
	1	4	0,23	—	0	I	I	—	0	II	II
	0	5	0,26	—	0	I	I	—	0	II	III
Dionin 4%	5	0	0,11	—	—	—	0	—	—	—	—
	4	1	0,14	—	—	—	0	—	0	I	II
	3	2	0,17	—	—	—	0	—	—	—	—
	2	3	0,20	—	—	—	0	0	I	II	III
	1	4	0,23	—	—	—	0	—	—	—	—
	0	5	0,26	—	—	—	0	—	—	—	—
Peronin 0,5%	5	0	0,04	—	—	—	0	—	0	I	I
	4	1	0,07	—	—	0	I	—	0	I	I
	3	2	0,10	—	0	I	I	—	0	I	II
	2	3	0,13	—	0	I	II	—	0	II	III
	1	4	0,16	0	II	II	II	0	II	II	V
	0	5	0,19	II	III	III	III	III	V	—	—

mäßigkeit erkennen, insofern mit zunehmender Chloridkonzentration des Milieus die Auflösungstendenz wächst und sich im gleichen Sinne auch der durch die Art des Auswaschens bedingte Chlorgehalt der Blutkörperchen bemerkbar macht. Relativ gering ist der Einfluß der Chlorionen bei Morphin. Umgekehrt ist bei Morphinsulfat und Dionin ganz auffällig der große Unterschied ihrer Wirkung gegen Rohrzucker- und Kochsalzblutkörperchen: Selbst in reiner Kochsalzlösung ist bei beiden jede Wirkung auf Rohrzuckerblutkörperchen aufgehoben; mag man auch bei der Gegenwart des Sulfations und gleichzeitig geringer Gesamtchlorkonzentration ein Verständnis dafür finden, so ist dies nicht leicht bei dem Dionin, das ja selbst ein Chlorid und das nächste Homologe des Kodeins ist. Zeigt sich doch an Rohrzuckerblutkörperchen selbst

bei doppelter Gesamtchlorkonzentration die gleiche Dioninmenge als unwirksam, die an Kochsalzblutkörperchen bereits hämolysiert. Mindestens folgt aus diesem Ergebnis, daß die zwei verschiedenen Waschprozeduren die Struktur der Körperchen in recht verschiedenem Zustande hinterlassen, so daß sie für die Wirkung mancher — doch nicht aller — Hämolytica große Empfindlichkeitsunterschiede aufweisen.

Eine Abweichung der Wirkungen des Dionins von seinen nächsten Verwandten prägt sich ja auch sonst aus: Man denke an die lymphtreibende und wesentlich stärkere anästhetische Wirkung[1]); vielleicht äußert sich in dem Verhalten gegenüber den Rohrzuckerblutkörperchen eine grundlegende Eigentümlichkeit dieses Alkaloids.

Die Summe der geschilderten Erfahrungen macht es unmöglich, die hämolytische „Wirkungsstärke" der untersuchten Alkaloide miteinander zu vergleichen; so wirkt z. B. Methylmorphin auf Kochsalzblutkörperchen schwächer, auf Zuckerblutkörperchen stärker als Äthylmorphin.

Beim Vergleich des Morphinchlorids mit dem Morphinsulfat ist zu bedenken, daß der osmotische Druck in den Sulfatlösungen etwas geringer war (vgl. oben). Jedoch ist die Summe der in beiden Reihen beobachteten Unterschiede nicht anders als durch die bekannten lyotropen Eigenschaften der beiden konkurrierenden Anionen Chlorid und Sulfat zu erklären.

Nach den bei den Alkaloiden gemachten Erfahrungen mußte es Interesse bieten, analoge Versuche mit Ammonsalzen zu wiederholen, um auf Grund eigener Anschauung die Analogien wie die Besonderheiten im Verhalten der komplizierten organischen Amine beurteilen zu können.

Die Versuche der Tabelle IV zeigen den bekannten Einfluß des Anions, dessen Angriffspunkt man ja zunächst an die permeablen Außenschichten der Blutkörperchen zu verlegen hat[2]). Auch hier ist wieder durchgehend die Begünstigung der Hämolyse durch Chlorid im Verhältnis zu Rohrzucker festzustellen.

Die Versuche der Tabelle V und VI ergänzen diese Feststellung dahin, daß Natriumsulfat gegenüber Ammoniumchlorid im Verhältnis zu Kochsalz sich analog wie Rohrzucker verhält und daß die gleiche Differenz zwischen Chlorid und Anelektrolyten auch bei der Hämolyse durch Hypotonie bemerkbar ist.

---

[1]) Vgl. *Rhode*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **91**, 186. 1921.

[2]) Vgl. *Hedin*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **68**, 229. 1897; **70**. 525. 1898. — *Radsma*, diese Zeitschr. **89**, 211, 217/18. 1918.

Tabelle IV.

Ammoniumsalze.

Salz	%	Normalität	Wasch- und Suspensionsflüssigkeit					
			Rohrzuckerlösung			Kochsalzlösung		
			nach Stunden					
			1	12	24	1	12	24
Tertiäres Phosphat	1,10	0,22	0	I	I	0	I	I
	0,80	0,16	—	—	0	0	I	I
	0,60	0,12	—	—	0	0	I	I
	0,38	0,08	—	—	0	—	—	0
Sulfat	1,32	0,20	0	I	II	0	II	III
	0,90	0,14	—	—	0	0	II	II
	0,65	0,10	—	—	0	0	II	II
	0,45	0,07	—	—	0	—	—	0
Chlorid	0,8	0,15	III	V	—	V	—	—
	0,6	0,11	II	II	II	V	—	—
	0,4	0,08	—	0	I	II	III	III
	0,2	0,04	—	—	0	—	—	0
Nitrat	1,2	0,15	V	—	—	V	—	—
	0,9	0,11	II	II	III	V	—	—
	0,6	0,08	—	0	I	II	III	III
	0,4	0,05	—	—	0	—	0	I

Tabelle V.

Chlorammonium. In 0,8 % NH_4Cl tritt nach weniger als 10 Minuten totale Hämolyse von Kochsalzblutkörperchen ein. In den Versuchen wird in je 5 ccm Volumen ein Anteil der Chlorammoniumlösung durch andere Lösungen ersetzt.

ccm Ersatzlösung	1			2			8			4		
nach Stunden	1/6	1 1/2	18	1/6	1 1/2	18	1/6	1 1/2	18	1/6	1 1/2	18
0,9% Kochsalz . .	V	—	—	III	V	—	0	I	III	—	0	I
1,42% Na_2SO_4 . .	0	I	II	—	0	I	—	—	0	—	—	0
8,5% Rohrzucker .	—	0	I	—	0	I	—	—	0	—	—	0
5,4% Dextrose . .	—	0	I	—	0	I	—	—	0	—	—	0
5,4% Mannit . . .	—	0	I	—	0	I	—	—	0	—	—	0
5,7% Rohrzucker .	I	I	II	—	0	I	—	—	0	—	—	0
3,6% Dextrose . .	—	I	II	—	0	I	—	—	0	—	—	0
3,6% Mannit . . .	I	I	II	—	0	I	—	—	0	—	—	0

Tabelle VI.

Hypotonie (Rohrzuckerblutkörperchen).

Substanz	%	Nach 24 Stunden	%	Nach Stunden		%	Nach Stunden		
				18	24		2	18	24
Kochsalz . . .	0,9	0	0,6	I	II	0,45	II	III	III
Rohrzucker . .	8,5	0	5,7	I	I	4,25	I	II	II
Dextrose . . .	5,4	0	3,6	—	0	2,7	0	I	I
Mannit	5,4	0	3,6	—	0	2,7	0	I	I

In mehreren Versuchen nahm ich mit Hilfe *Hamburger*scher Konohämatokriten Messungen von Kochsalz- und Rohrzuckerblutkörperchen vor. Schweineblutkörperchen wurden abzentrifugiert, *nicht* gewaschen. Vom Brei je 2 ccm aufgeschwemmt mit je 100 ccm Lösung von 8,5% Rohrzucker, 5,4% Dextrose, 1,4% Na_2SO_4 oder 0,9% NaCl. Von den Mischungen nach verschiedenen Zeiten je 1 ccm im Konohämatokriten zentrifugiert bis zur Volumenkonstanz der Blutkörperchensäule. Die abgelesenen Zahlen für dieses Volumen in Kubikmillimetern finden sich in der Tabelle VII verzeichnet. Andere Versuche wurden bei sonst gleichem Verfahren darin abgeändert, daß die Blutkörperchen vor der endgültigen Mischung bereits 3 mal mit der zum Versuch benutzten Lösung gewaschen waren; sie finden sich in Tabelle VIII. In den Tabellen bedeuten die Zeichen *R*, *D*, *S*, *C* die benutzten Lösungen; St die Anzahl Stunden zwischen Mischung und Ablesung.

Tabelle VII.

Std.	*R*	*D*	*S*	*C*
3/4	22,8	22,5	18,0	21,0
4	20,1	20,0	17,2	19,5
7	16,8	16,6	16,0	18,0
21	14,0	13,0	12,0	18,0

Auch *Handovsky*[1]) fand an Blutkörperchen vom *Kaninchen* in Rohrzucker das Volumen geringer als in Kochsalz.

In Übereinstimmung mit *Gürber* fand ich bei Rohrzuckerblutaufschwemmung häufig dunkle violette Färbung, die beim Schütteln mit Luft wieder hellrot wurde, also auf Sauerstoffzehrung beruhte; bei Dextrose und Mannit beobachtete ich ein Gleiches nicht; alle Lösungen waren *frisch* hergestellt.

Tabelle VIII.

Std.	*R*	*D*	*S*	*C*
1/2	30,0	25,0	23,7	29,8
1/2	11,6	13,6	11,1	12,4
18	11,0	10,8	11,7	13,3
1	17,0	15,6	19,2	19,8
4	19,8	18,6	19,8	21,1
18	15,0	13,7	14,9	18,0
1 1/2	20,1	19,9	20,0	23,0
4	18,0	16,5	18,8	21,2
8	22,0	19,0	22,4	23,9
24	15,6	14,0	15,3	18,8
2	22,0	22,0	19,9	23,0
5	23,0	23,0	23,4	25,8
8	19,6	—	19,0	21,6
24	16,0	16,4	16,5	18,0
4	19,0	17,5	18,6	21,6
16	16,2	15,8	17,0	19,0

Das Prinzipielle dieser Beobachtungen ist nicht neu: Geringeren Hämolysegrad in Zuckerlösung gegenüber Kochsalzlösung fanden *Willerding*[2]) und *Snapper*[3]) für Hypotonie, *Arrhenius* und *Madsen*[4]) für Immunohämolysine, *Miculicich*[5]) für Narkotica und Saponin, *Stadler* und *Kleemann*[6]) für Ammoniak, weniger für Essigsäure, *Luger*[7]) für Chinin. Genauere quantitative Untersuchungen über die Saponinhämolyse in Mischungen von Rohrzucker-, Kochsalz- und anderen Salzlösungen stellte *H. Handovsky*[8]) an.

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **195**, 253. 1922.

[2]) *Willerding*, Hamburgers Blutkörperchenmethode. Inaug.-Diss. Gießen 1897; zit. nach *Ege* S. 567[3]).

[3]) Diese Zeitschr. **43**, 266. 1912.

[4]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **44**, 33. 1903.

[5]) Zentralbl. f. Physiol. **24**, 523. 1911.

[6]) Diese Zeitschr. **36**, 301, 321. 1911.

[7]) Diese Zeitschr. **117**, 145. 1921.

[8]) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **69**, 412. 1912. — Verhandl. d. dtsch. pharmakol. Ges. zu Freiburg. 1921. XXX. — Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **190**, 173. 1921; **195**, 253. 1922.

Das Wesen des Unterschiedes in dem Verhalten von Kochsalz- und Rohrzuckerblutkörperchen ist nicht restlos zu durchschauen, da ja anerkanntermaßen jede Art der Waschung die Blutkörperchen verändert; allerdings verhalten sich bei konsequenten Waschungen mit Rohrzucker die Blutkörperchen verschiedener Tierarten erstaunlich verschieden, wie *Gürber*[1]) gezeigt hat. Jedoch sprechen mancherlei Beobachtungen dafür, daß die ursprüngliche kolloidchemische Struktur der Körperchen, mindestens soweit sie für Hämolyse in Frage kommt, vielfach besser in Zuckerlösung als in Kochsalzlösung erhalten bleibt.

Snapper[2]) ermittelte am menschlichen Blute, daß die Resistenz gegen hypotonische Kochsalzlösungen gleich war bei ungewaschenen und zuckergewaschenen, dagegen vermindert bei kochsalzgewaschenen; die ursprüngliche Resistenz blieb erhalten nach Waschung mit einer Lösung von 0,9 proz. Kochsalz und 0,1 proz. Calciumchlorid. *Ege*[3]) fand ein Anschwellen der Körperchen bei Behandlung mit Chlorid (und Nitrat), das nach etwa einer Stunde sein Maximum erreichte und dann langsam im Laufe eines Tages zurückging, während ihr Volumen in Zuckerlösung viele Stunden konstant blieb; verglich er das Körperchenvolumen bei verschiedenen, doch isosmotischen Konzentrationen von Natriumchlorid und -sulfat, so war es im Sulfat stets kleiner, aber ebenso groß wie in Zuckerlösung. *Scott*[4]) wies nach, daß isotonische Kochsalz- oder Ringerlösung den Blutkörperchen stickstoffhaltige Proteinsubstanz entzieht. *Rous* und *Tourner*[5]) stellten fest, daß monatelange Konservierung von Blutkörperchen gelingt, wenn man sie in Mischungen von äquilibrierten Salzlösungen mit höheren Konzentrationen von Rohrzucker oder Dextrose gibt. Die Summe dieser Beobachtungen gibt mindestens zu bedenken, ob nicht der Zucker zu gering geschätzt wird, wenn man ihn einfach als indifferentes, nur osmotisch wirksames Agens betrachtet, ob er nicht vielmehr auch eine kolloidchemische Wirksamkeit — wenn auch geringen Grades — besitzt und „verfestigend" auf die Strukturelemente der Blutkörperchen wirkt, also ähnlich wie etwa das Sulfation. Die Einreihung des Mannits unter die „salinischen" Abführmittel deutet ja von altersher ähnliche Beziehungen an.

M. H. Fischer und *Sykes*[6]) beschrieben eine quellungswidrige Wirkung des Traubenzuckers und besonders des Rohrzuckers bei der Quellung von Gelatine. Die Erstarrung verflüssigter Gelatine wird durch Mannit und Rohrzucker beschleunigt[7]), der Elastizitätsmodul von Gelatinegallerte durch Rohrzucker stark erhöht (dagegen durch Kochsalz erniedrigt)[8]). Die Verkleisterungstemperatur der Stärke wird durch Dextrose (ebenso wie durch Sulfat usw.) erhöht[9]). Alle diese Beobachtungen sind Anhaltspunkte dafür, daß die Zucker kolloidchemisch wirksam sind oder wenigstens sein können.

---

[1]) Salze des Blutes. II. Habilitationsschrift Würzburg 1904.

[2]) Diese Zeitschr. **43**, 266. 1912.

[3]) Diese Zeitschr. **115**, 109. 1921.

[4]) Journ. of physiol. **50**, 128. 1916.

[5]) Nach Malys Jahresberichten 1915, S. 72; 1916, S. 97.

[6]) *Fischer* und *Sykes*, Oedema and Nephritis. 2. Aufl., Newyork 1915, S. 305; ferner Kolloidzeitschr. **14**, 215, 223. 1914.

[7]) *Pauli* und *Rona*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 25. 1902.

[8]) *Leick*, zit. nach *Handovsky*, Leitfaden der Kolloidchemie. Dresden 1922, S. 166.

[9]) *Samec*, zit. nach *Handovsky*, Leitfaden S. 178.

Wie es scheint, zeigen diese wasserlöslichen Anelektrolyten in gewisser Beziehung auch Analogien zu „lipoidlöslichen“, so z. B. nach *Rona* und *Michaelis* bei der Adsorption an Tierkohle[1]). Es ist daher wohl die Frage erlaubt, ob die hämolysehemmende Wirkung kleiner Dosen von Narkoticis[2]) und ähnlichen Stoffen[3]) mit der gleichsinnigen Wirkung des Zuckers wesensverwandt ist; *E. von Knaffl-Lenz* fand bei ihnen nach längerer Einwirkung Volumenverminderung der Blutkörperchen[4]).

Es ist vielleicht richtig, die Zuckerblutkörperchen als solche zu betrachten, bei denen die Salze ausgewaschen und durch Zucker ersetzt, zugleich aber auch in ihrer kolloidchemischen Funktion zum Teil vertreten sind, so daß das Gefüge der Zellen ungefähr die gleiche Resistenz gegenüber hämolytischen Einflüssen behält wie die frischen ungewaschenen Blutscheiben. Immerhin ist die Auffassung nicht ganz von der Hand zu weisen, daß die bloße Entziehung von Salz durch Waschen mit Zuckerlösung die Zellkolloide ähnlich beeinflußt wie etwa Sulfat, Calcium usw. *Handovsky* kam nach seinen umfangreichen Untersuchungen[5]) zu der Anschauung, daß Rohrzucker die Kolloide der Blutscheiben *gelatiniere.*

Unter den verschiedenen Formen von Hämolyse gehört die durch Alkaloide unstreitig zu denen, die *nach dem Eindringen* des wirksamen Stoffes in die Hauptmasse der Körperchensubstanz zustande kommt. Das ist aus den Untersuchungen von *Grijns*[6]) und *Hedin*[7]) an den Salzen des Ammoniums und einfacher organischer Basen und dem durchaus analogen Verhalten komplizierter gebauter Basen mit Bestimmtheit zu folgern, selbst wenn man anerkennt, daß die von *Grijns* verwandte chemisch-analytische, wie die von *Hedin* benutzte kryoskopische Methode keinen sehr hohen quantitativen Ansprüchen genügten. Bei Saponin dagegen darf man mindestens zweifelhaft sein, unter welchen Bedingungen es weit über die Oberfläche hinaus nach innen dringt.

Hält man sich dies vor Augen, so wird man berechtigt sein, 2 Vorgänge und dementsprechend auch 2 Arten von Einflüssen bei dem Gesamtkomplex „Hämolyse“ zu unterscheiden: Einmal das Einwandern selbst, für das der Zustand an der Grenzfläche der Blutscheiben gegen das Medium von besonderer Bedeutung sein wird, zweitens die durch eindringende Hämolytica an der inneren Substanz der Blutkörperchen gesetzten Veränderungen. Durch diese Unterscheidung wird man ein Verständnis dafür gewinnen können, daß z. B. Sulfat die Morphinhämolyse viel stärker hemmt als die Saponinhämolyse (nach *Handovsky*), oder daß das Auswaschen der Blutkörperchen mit Zuckerlösung eine weit bedeutendere Änderung der Empfindlichkeit mit sich bringen kann als das Aufschwemmen in Zuckerlösung nach Auswaschung

[1]) Diese Zeitschr. **16**, 489. 1909; **64**, 288. 1914; **94**, 240. 1919.

[2]) *Arrhenius* und *Bubanovic*, zit. nach *Höber*, Physikalische Chemie der Zelle. 4. Aufl. 1914, S. 466.

[3]) *Rhode*, diese Zeitschr. **130**, 495. 1922.

[4]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **171**, 51. 1918.

[5]) Vgl. Zitat oben S. 566[1]).

[6]) Pflügers Arch. f. die ges. Physiol. **63**, 86. 1896.

[7]) Ebenda **68**, 229. 1897; **70**, 525. 1898.

mit Kochsalzlösung, wie es sich in so frappanter Weise beim Dionin zeigt. Die Versuchsergebnisse der Tabelle III wären dann in der Weise zu deuten, daß bei allen Alkaloiden etwa gleichmäßig das Eindringen durch Rohrzuckergehalt des Mediums erschwert, durch Kochsalz erleichtert wird (Vergleich der vertikalen Versuchsreihen), daß aber beträchtliche Differenzen der Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenen Basen im Inneren der Blutkörperchen bestehen, je nachdem ob diese mit Kochsalz oder mit Rohrzucker sozusagen „imprägniert" sind (Vergleich der horizontalen Versuchsreihen). Hier zeigt sich unter den Homologen Morphin, Methyl- und Äthylmorphin eine deutliche Reihe, insofern als der Empfindlichkeitsunterschied bei Kodein merklich größer ist als beim Morphin, wenn auch der Sprung zum Dionin noch beträchtlicher ist. Benzylmorphin steht in dieser Beziehung dem Kodein am nächsten. Bei dem Morphinsulfat scheint sich das Sulfation sowohl an den Außenschichten im Sinne verminderter Durchlässigkeit wie im Inneren der Blutkörperchen im Sinne verminderter Hämolysetendenz, stets aber entsprechend bekannten Gesetzen in Konkurrenz zu dem gegenwirkenden Chloridion zu betätigen.

Freilich werden durch diese Betrachtungen nicht alle Rätsel gelöst. Erstaunlich bleibt z. B. der nachhaltige Einfluß der Vorbehandlung oft unter Bedingungen, die einen Ausgleich erwarten lassen sollten. Warum etwa Rohrzuckerblutkörperchen durch reichliche Mengen Chlorid in Form von Kochsalz und Dionin binnen 24 Stunden nicht in den gleichen „aufgelockerten" Zustand rückverwandelt werden, wie Kochsalzblutkörperchen bei Gegenwart von viel weniger Chlorid und reichlich Rohrzucker, ist schwer verständlich.

Zusammenfassung.

1. Morphin und sein Methyl-, Äthyl- und Benzylderivat hämolysieren als Chloride kochsalzgewaschene Blutkörperchen in zunehmendem Grade. Bromide, Sulfate und Phosphate wirken schwächer.

2. Waschen der Blutkörperchen mit Rohrzucker schwächt die Wirkung aller genannten Alkaloide ab, jedoch stark zunehmend in der Reihe Morphin → Kodein → Dionin, so daß unter diesen Bedingungen die Wirksamkeit der 3 Chloride in umgekehrter Reihenfolge, also vom Dionin zum Morphin, anwächst.

3. Analoge Differenzen an Rohrzucker- und Kochsalzblutkörperchen weist auch die Hämolyse durch Ammoniumsalze auf.

4. Zuckerblutkörperchen vom Schwein scheinen ein kleineres Volumen zu besitzen als Kochsalzblutkörperchen.

Zur Chemie der Schwarzfärbung kohlenhydrathaltiger Nährböden durch den Bacillus mesentericus var. niger.

Von

Anna Muschel.

(Aus dem Staatlich-serotherapeutischen Institut in Wien, Biochemische Abteilung.)

(Eingegangen am 6. Mai 1922.)

Der Bacillus mesentericus var. niger *) wächst auf Nähragar, ohne die Farbe des Nährbodens zu verändern, während er auf Traubenzuckeragar sehr üppig wächst und im Verlaufe von ungefähr 5 Tagen den Nährboden bräunt. Die Braunfärbung schreitet dann fort und geht in manchen Fällen bei öfter überimpften Kulturen fast bis zu einer Schwarzfärbung. Diese Beobachtung wurde bereits von *Biel* und *Lunt* gemacht. *Biel* beobachtete auch eine schwache Braunfärbung auf Agarkulturen, sowie eine Verflüssigung der Gelatine unter Graufärbung derselben. Auch in gekochter Stärke, der etwas Pepton zugesetzt wird, gedeiht der Bacillus, wie *Biel* beobachtete, sehr gut unter Dunkelfärbung derselben. Ferner zeigt eine Kartoffel, die mit Bacillus mesentericus niger beimpft wurde, anfangs Blaufärbung, später durchgehende Schwarzfärbung.

Da es naheliegend war, die Dunkelfärbung der Nährböden auf einen den Melaninen nahestehenden Körper zurückzuführen, wurde in dem Nährboden nach dem Vorhandensein einer Tyrosinoxydase gesucht, analog der von *Abderhalden* versuchten Isolierung einer Tyrosinase aus dem Pilze Russula delica; doch ließ sich in dem Toluolwasserauszug aus beimpftem Traubenzuckeragar keine Tyrosinase nachweisen.

Traubenzuckeragar wurde mit einer Reinkultur von Bacillus mesentericus niger beimpft. Nach einiger Zeit war der Nährboden braunschwarz geworden, die Bakterien waren üppig gewachsen. Nach 3 Wochen wurde dieser Nährboden durch 24 Stunden bei 37° mit Toluolwasser extrahiert (1 ccm Toluol auf 100 ccm Aqua destillata). Die braungefärbte, schwach alkalisch reagierende Fermentlösung, die einen an Heringslake

---

*) Die Kultur wurde mir aus seiner mikrobiologischen Sammlung von Prof. Dr. *Přibram* zur Verfügung gestellt, dem ich auch das vorliegende Thema sowie Unterstützung bei meiner Arbeit verdanke.

erinnernden Geruch zeigt, wurde nun, wie nachstehende Tabelle zeigt, auf verschiedene aromatische Verbindungen einwirkengelassen.

1 ccm Fermentlösung Wirkung auf je 4 ccm $^{n}/_{10}$-Lösung von:	20 Stunden bei 37°:
Tyrosin ($^{n}/_{100}$)	—
Phenol	—
Brenzcatechin	Nach 2 Stunden leichte Rotfärbung, nach 20 Stunden Braunfärbung.
Resorcin	Rosafärbung, dann schwache Braunfärbung.
Hydrochinon	Fast sofort Rotfärbung, nach 20 Stunden intensiv rot.
Salicylsäure	—
α-Naphthol	Schwache Braunfärbung.
β-Naphthol	—

Die Fermentlösung bläut Guajactinktur. Aus Jodkaliumlösung macht sie kein Jod frei. Das Ferment wirkt am besten in schwach alkalischem Medium.

Die Fermentwirkung wird ähnlich wie die der Lactase von Mangan- und Eisensalzen katalytisch beeinflußt, wie folgender Versuch zeigt (die Beobachtung erfolgte bei Zimmertemperatur):

0,1 ccm Fermentlösung	Je 1 Tropfen verdünnte Lösung von: a) Mangansulfat	b) Ferrosulfat
0,3 ccm $^{n}/_{10}$-Hydrochinon	Sofort Rotfärbung.	Nach einiger Zeit Braunfärbung.
0,3 ccm $^{n}/_{10}$-Resorcin	Sofort Braunfärbung.	Nach einiger Zeit Braunfärdung.
0,3 ccm $^{n}/_{10}$-Brenzcatechin	Nach einiger Zeit Grünfärbung.	Violettfärbung, die nach einiger Zeit in Tiefblau umschlägt; im Brutschrank wird die Farbe tiefschwarz.

Die Fermentwirkung wird gehemmt durch Zinnchlorür. Der Toluolwasserauszug aus Nähragar, der mit Bacillus mesentericus niger beimpft wurde, gibt ähnliche Reaktionen wie der Toluolwasserauszug aus analog beimpftem Traubenzuckeragar. Dagegen zeigt dieser Auszug aus unbeimpftem Traubenzuckeragar keine Fermentreaktionen.

Aus diesen Versuchen scheint hervorzugehen, daß der Bacillus mesentericus niger keine Tyrosinase, sondern eher eine Polyphenoloxydase bildet. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde nun die Reaktion verwendet, die *Schulze* zum Nachweis von Polyphenoloxydasen in Bakterienkulturen ausgearbeitet hat; doch wurde abweichend von der Originalvorschrift zur Lösung des α-Naphtols Normalnatronlauge verwendet, weil sich so viel leichter ein Überschuß von Alkali vermeiden ließ, der die Reaktionsschärfe beeinträchtigt.

Es wurden nun nach der Methode von *Schulz* sowohl Toluolwasserauszüge von Reinkulturen des Bacillus mesentericus niger wie auch Kolonien auf der Agarplatte auf ihre Oxydationswirkung geprüft.

Wird die Lösung von α-Naphthol unter Zusatz von Normalnatronlauge hergestellt, so zeigte die Reaktion nach *Schulze* folgendes Ergebnis:

1,5 ccm des Oxydasereagens nach *Schulze* wurde mit 0,5 ccm Fermentlösung resp. 0,5 ccm Aqua destillata gemischt.

Das Röhrchen, welches die Fermentlösung enthält, wird auf kurze Zeit durch die gelbe Farbe der Fermentlösung grünblau gefärbt; schüttelt man aber beide Röhrchen an der Luft, so färbt sich das Röhrchen, welches die Fermentlösung enthält, dunkelblau und wird fast undurchsichtig, während die Kontrolle durchsichtig bleibt und eine Zwischenfarbe zwischen amethyst- und veilchenblau zeigt. Nach 2stündigem Stehen bei 37° bleibt der Unterschied bestehen*).

Es wurden auch Kontrollen angestellt, um zu sehen, ob nicht Verunreinigungen des Toluols auf das Oxydasenreagens einwirken, und andererseits, um die Reaktion von beimpftem und unbeimpftem Traubenzuckeragar auf das Oxydasenreagens kennenzulernen.

Es wurden verwendet: Eine 10 Tage alte, auf Traubenzuckeragar geimpfte Mesentericuskultur, ferner unbeimpfter Nähragar und unbeimpfter Traubenzuckeragar. Die Röhrchen wurden 24 Stunden bei 37° mit Toluolwasser extrahiert. Auf 2 ccm des Reagens nach *Schulze* wurden 0,5 ccm der Extrakte aus den verschiedenen Nährböden genommen. Die Versuche zeigten folgendes Ergebnis:

Toluolwasserauszug aus Traubenzuckeragar, der mit *Bacillus mesentericus niger beimpft* wurde. Beim Schütteln an der Luft in 2—5 Minuten intensive Blaufärbung mit grünem Einschlag, wird nach einer halben Stunde bei 37° intensiver.

Toluolwasserauszug aus *unbeimpftem Traubenzuckeragar*. Beim Schütteln an der Luft erst nach 10—15 Minuten ganz schwache Blaufärbung; die Farbe wird nach einer halben Stunde bei 37° intensiver, aber nicht so intensiv wie beim Auszug aus der Mesentericuskultur.

Toluolwasserauszug aus einem *unbeimpften, zuckerfreien* Nähragarröhrchen. Ähnliches Resultat wie bei unbeimpftem Traubenzuckeragar.

Kontrolle mit Toluolwasser. Keine Veränderung beim Schütteln an der Luft; die ursprünglich amethystblaue Farbe wird nach einer halben Stunde bei 37° etwas intensiver, aber nicht dunkelblau.

Die Oxydasenreaktion nach *Schulze* verwendet eine der Indophenolprobe nach *Spitzer-Röhmann* analoge Reaktion:

$$C_6H_4(NH_2)_2 + C_{10}H_7OH + O = NH\begin{cases} C_6H_4NH_2 \\ C_{10}H_6OH \end{cases}$$

$$NH\begin{cases} C_6H_4NH_2 \\ C_{10}H_6OH \end{cases} + O = N\begin{cases} C_6H_4NH_2 \\ C_{10}H_6O \end{cases}$$

*) Schon die ursprüngliche Lösung des Schulze-Reagens nimmt nach sehr kurzer Zeit beim Stehen an der Luft eine rosa- bis amethystartige Färbung an.

Das Ergebnis der Oxydasenreaktion nach *Schulze* in diesem Falle bekräftigt also die Annahme, daß der Bacillus mesentericus niger eine Polyphenoloxydase bildet.

Da sich aus den Versuchen ergibt, daß die Oxydase besonders auf Brenzcatechin und Hydrochinon wirkt, wurde versucht, im Agarröhrchen ohne Zuckerzusatz und in solche mit Zusatz von verschiedenen Zuckerarten Hydrochinon resp. Brenzcatechin zuzusetzen und die Zeit des Eintrittes der Schwarzfärbung oder Bräunung mit der Zeit zu vergleichen, in der eine solche Färbung im Nähragar eintritt, der nur die betreffende Zuckerlösung enthält. Alle Röhrchen wurden beimpft. Wenn die Färbung in dem Hydrochinon- oder brenzcatechinhaltigen Röhrchen früher eintritt, so ist die Annahme naheliegend, daß das Bakterium aus den Bestandteilen des Zuckeragars Hydrochinon oder Brenzcatechin oder einen diesen Dioxybenzolen ähnlichen Körper freimacht, der dann durch Oxydation die braune bis schwarze Farbe liefert.

Die Versuchsergebnisse zeigt umstehende Tabelle.

Es wurde nun die Wirkung des Bakteriums auf 2 sechswertige Alkohole und einen dreiwertigen Alkohol versucht, und zwar wurden zu den Versuchen Mannit resp. Dulcit und Glycerin verwendet. Da beide ersteren Substanzen schwer zu beschaffen waren, wurden nur 0,5% zu jedem Nähragarröhrchen zugesetzt (siehe Tabelle).

Wie aus den Versuchen hervorgeht, verhält sich Mannose anders als die übrigen Zuckerarten. Dem entspricht auch das Verhalten des Alkohols Mannit, während ein Zusatz von dem der Galaktose entsprechenden Alkohol Dulcit eine Bräunung im Nähragar hervorruft. Dies stimmt mit der Beobachtung von *Nencki* und *Sieber* überein, daß Mannit von Alkalien bei Bruttemperatur nicht angegriffen wird.

Da sich eine mit Bacillus mesentericus niger beimpfte Kartoffel dunkel färbt und der Bacillus auch in gekochter Stärke mit Peptonzusatz unter Dunkelfärbung des Nährbodens wächst, konnte man bei der Frage nach der Herkunft der Dioxybenzole oder deren Derivate, die vielleicht an der Dunkelfärbung beteiligt sein konnten, auch an Eiweißabbau und Oxydation der Spaltprodukte denken, ähnlich wie bei der Entstehung der Homogentisinsäure aus Tyrosin.

OH–C_6H_4–CH_2–CHNH$_2$–COOH (HOOC—CHNH$_2$) ⟶ OH–C_6H_4–CH_2–CO–COOH (HOOC—CO) ⟶ O=C_6H_4(OH)(CH$_2$–COOH) *) ⟶ C_6H_3(OH)$_2$–CH$_2$ · COOH

*) Hypothetisch.

	Nähragar: 1000 ccm Fleischwasser (500 g Rindfleisch auf 1 Liter Wasser) 10 g Pepton 5 g Kochsalz 3 ccm Normalsodalösung über dem Neutralpkt. 20 g festes Agar	(Monosaccharide) *Zuckerzusatz* (2%) zum Nähragar		Beimpft mit	Beobachtet am		
			Dioxybenzole 0,04%		3. Tag	5. Tag	8. Tag
	Nähragar	Dextrose	Hydrochinon	Bacillus mesentericus niger	*Schwarz*färbung	intensive Schwärzung	intensive Schwärzung
	dgl.	dgl.	0	dgl.	Eigenfarbe	leichte Bräunung	starke Braunfärbung
Kontrolle	dgl.	dgl.	Hydrochinon	0	dgl.	Eigenfarbe	Eigenfarbe
	dgl.	dgl.	0	Bacillus mesentericus niger	leichte Bräunung	Bräunung	intensivere Bräunung
dgl.	dgl.	dgl.	Brenzkatechin	0	dgl.	leichte Bräunung	leichte Bräunung
	dgl.	Mannose	dgl.	Bacillus mesentericus niger	Eigenfarbe	Eigenfarbe	dgl.
dgl.	dgl.	dgl.	0	0	dgl.	dgl.	Eigenfarbe
	dgl.	Galactose	0	Bacillus mesentericus niger	starke *Schwärzung*	Schwärzung	Schwärzung
	dgl.	dgl.	Hydrochinon	dgl.	Eigenfarbe	keine durchgehende Schwärzung	keine durchgehende Schwärzung
dgl.	dgl.	dgl.	0	0	dgl.	Eigenfarbe	Eigenfarbe
	dgl.	Laevulose	0	Bacillus mesentericus niger	Bräunung	Schwärzung	Schwärzung
	dgl.	dgl.	0	dgl.	Eigenfarbe	dgl.	dgl.
dgl.	dgl.	dgl.	Hydrochinon	0	dgl.	ganz leichte Bräunung	ganz leichte Bräunung
	dgl.	0	Brenzkatechin	Bacillus mesentericus niger	starke Schwärzung	Schwärzung	Schwarzfärbung
dgl.	dgl.	0	dgl.	0	kaum merkliche Bräunung	kaum merkliche Braunfärbung	kaum merkliche Braunfärbung

	Nähragar: 1000 ccm Fleischwasser (500 g Rindfleisch auf 1 Liter Wasser) 10 g Pepton 5 g Kochsalz 3 ccm Normalsodalösung über dem Neutralpkt. 20 g festes Agar	Zuckerzusatz (2%) Bisaccharide	Dioxybenzole 0,04%	Beimpft mit	Beobachtet am 3. Tag	5. Tag	8. Tag
	Nähragar	Lactobiose	Hydrochinon	Bacillus mesentericus niger	leichte Bräunung	starke Schwärzung	Schwärzung
	dgl.	dgl.	0	dgl.	dgl.	Bräunung	Bräunung
Kontrolle	dgl.	dgl.	Hydrochinon	0	Bräunung	dgl.	dgl.
	dgl.	Saccharose	dgl.	Bacillus mesentericus niger	Schwarzfärbung	starke Scnwärzung	Schwärzung
	dgl.	dgl.	0	dgl.	Eigenfarbe	Braun-Schwarz-färbuug	Braun-Schwarz-färbung
dgl.	dgl.	dgl.	Hydrochinon	0	dgl.	leichte Bräunung	leichte Bräunnng

	Nähragar: 1000 ccm Fleischwasser, 10 g Pepton, 5 g Kochsalz, 3 cm Normalsodalösung über dem Neutralpnnkt	Alkoholzusatz zum Nähragar	Beimpft mit	Beobachtet am 3. Tag	5. Tag	8. Tag
	Nähragar	Glycerin	Bacillus mesentericus niger	Bräunung	stärkere Bräunung	Bräunung
Kontrolle	dgl.	dgl.	0	Eigenfarbe	Eigenfarbe	Eigenfarbe
	dgl.	Mannit	Bacillus mesentericus niger	ganz leichte Bräunung	leichte Bräunung	leichte Bräunung
dgl.	dgl.	dgl.	0	Eigenfarbe	Eigenfarbe	Eigenfarbe
	dgl.	Dulcit	Bacillus mesentericus niger	starke Bräunung	Bräunung	Bräunung
dgl.	dgl.	dgl.	0	Eigenfarbe	Eigenfarbe	Eigenfarbe

Ein ähnliches Derivat würde dann durch Fermentwirkung die Dunkelfärbung des Nährbodens hervorrufen.

Es wurde daher zu Nähragar resp. Traubenzuckernähragar Tyrosin zugesetzt und beobachtet, ob in dem beimpften Nährboden Braunfärbung eintritt.

1a. Nähragar mit 0,03‰ *Tyrosin beimpft* (angesetzt am 30. XI.):
3. XII. Leichte Bräunung, Häutchen gelblich.
7. XII. Bräunung.

1b. Nähragar mit 0,03‰ *Tyrosin, unbeimpft* (angesetzt am 30. XI.):
3. XII. bis 15. XII. Keine Veränderung.

2a. Nähragar mit 2% *Dextrose* und 0,03‰ *Tyrosin, beimpft* (angesetzt am 30. XI.):
3. XII. Ganz leichte Bräunung, Häutchen grünlich.
6. XII. Intensivere Bräunung.
8. XII. Starke Bräunung.
16. XII. Sehr starke Bräunung, das Röhrchen ist undurchsichtig, die Bräunung ist stärker als bei beimpftem Traubenzuckernähragar.

2b. Nähragar mit 2% *Dextrose* und 0,03‰ *Tyrosin, unbeimpft* (angesetzt am 30. XI.):
2. XII. bis 7. XII. Keine Reaktion.

Da eine direkte Wirkung des Fermentextraktes, wie oben gezeigt wurde, auf das Tyrosin nicht vorhanden ist, wohl aber, wie aus den obigen Versuchen hervorgeht, bei Gegenwart von Spuren von Tyrosin durch die lebenden Bakterien eine Bräunung des Nährbodens hervorgerufen wird, müssen wir die Annahme machen, daß unter den Abbauprodukten des Tryosin ein Körper besteht, welcher am Benzolring 2 Hydroxylgruppen trägt. Dieser Körper könnte für die Braunfärbung verantwortlich gemacht werden.

Um die Bestandteile der Nährbouillon (Pepton, Extraktivstoffe des Fleisches) von ihrer Rolle an der Pigmentbildung auszuscheiden, wurde das Bakterium auf einer künstlichen Nährlösung gezüchtet, der die entsprechenden Stoffe, die man als Pigmentbildner vermutete, zugesetzt wurden. Verwendet wurde die *Fränkel*sche Nährlösung. Sie enthielt nach den Angaben der Literatur: Kochsalz 5 g, Monokaliumphosphat 2 g, Ammonium lacticum 6 g, Asparagin 4 g, Normalnatronlauge 20 ccm und 1000 ccm Aqua destillata. Statt Monokaliumphosphat*) wurde tertiäres Kaliumphosphat, statt Asparagin die Substanz zugesetzt, die man als Pigmentbildner vermutete. Das ist also einerseits das Tyrosin (und zwar 2 g auf 1000 ccm), andererseits Zucker (2%), da in den beimpften Röhrchen meistens bei Zuckerzusatz eine Bräunung zu beobachten war. Die Nährlösung wurde mit 2% festem Agar versetzt und zum Verflüssigen des Agars ca. 5 Stunden im Dampfsterilisator gekocht.

---

*) Das zur Zeit nicht beschafft werden konnte.

1. *Fränkel*sche Nährlösung mit 2% Agar, welche 2‰ *Tyrosin* enthält, *beimpft* (angesetzt am 3. XII.):

4. XII. Schwaches Wachstum, leichte Rosafärbung.
6. XII. Braunfärbung, schleimiges Wachstum.
8. XII. Etwas intensivere Bräunung, die Braunfärbung nur an der Oberfläche.

2. *Fränkel*sche Nährlösung mit 2‰ *Tyrosin, beimpft* (angesetzt am 3. XII.):

6. XII. Schwaches Wachstum, Gelbfärbung.
8. XII. Hellbraunfärbung, am Boden schwarze Partikelchen.

3. *Fränkel*sche Nährlösung mit 2‰ *Tyrosin, beimpft* (angesetzt am 24. XII.):

27. XII. Schwaches Wachstum, Häutchenbildung.
28. XII. Braunfärbung.
4. I. Stärkere Bräunung am Boden des Gefäßes Krystalle, die im Mikroskop als Tyrosin identifiziert wurden.

(Unbeimpfte Kontrolle bleibt unverändert.)

Im Falle 2 und 3 wurde ein flüssiger Nährboden verwendet. Die alkalische Flüssigkeit wurde, nachdem Tyrosin zugesetzt war, nicht mehr erhitzt.

Auch auf *Fränkel*sche Nährlösungen, welche an Stelle von Tyrosin 2% Traubenzucker oder Milchzucker enthielten, wuchs der Bacillus mesentericus niger unter Braunfärbung der Lösung.

Es mußten nun jene Bestandteile der *Fränkel*schen Nährlösung, welche neben Zucker oder Tyrosin als Pigmentbildner in Betracht kommen könnten, auf ihre Fähigkeit, Pigment zu bilden, untersucht werden. Zu diesem Zwecke wurde ein Nähragarröhrchen, dem 2‰ *Ammonium lacticum Merck* zugesetzt wurden, *beimpft* (und zwar am 21. XII.).

22. XII. Gutes Wachstum, Häutchenbildung.
23. XII. Keine Braunfärbung.
24. XII. Keine Braunfärbung.
27. XII. Ganz leichte Braunfärbung.

Die Braunfärbung ist kaum merklich und keineswegs so intensiv wie die Bräunung im Nähragar, welcher Zucker oder Tyrosin enthält. Es kann also die Braunfärbung nicht durch Ammonium lacticum bedingt sein*).

Da die Bräunung vorzugsweise bei Zuckerzusatz in den Nährböden auftritt, war zu untersuchen, in welchen Spaltprodukten des Zuckers die Ursache der Braunfärbung liegen konnte.

---

*) Es wurde auch der Versuch gemacht, das Bacterium auf einer anderen Nährlösung zu halten, und zwar einer Nährlösung, die *Abderhalden* als Nährboden für Hefe vorschlägt: Magnesiumsulfat 0,5 : 1000, tertiäres Kaliumphosphat 1 : 1000, Kaliumchlorid 0,5 : 1000, Ferrosulfat 0,1 : 1000, Glykose 2 : 100, Glykokoll 4 : 1000. Die Nährlösung wurde beimpft am 31. XII.

3. I. Schwaches Wachstum.
13. I. Schwache Gelbfärbung.
18. I. An der Oberfläche vereinzelte braune Häutchen.
20. I. Von der Oberfläche aus Dunkelwerden der Flüssigkeit, schwarzer Bodensatz.

Wie aus der Literatur hervorgeht, entsteht aus Zucker durch Einwirkung von Alkali bei höheren Temperaturen sowie durch ähnliche Arten der Zersetzung aromatische Körper, wie Brenzcatechin, Protocatechusäure u. a.*).

Es wurde nun versucht, Brenzcatechin nachzuweisen in *Fränkel*schen Nährlösungen, welche Traubenzucker enthielten und mit Bacillus mesentericus beimpft waren. Doch waren die Ausbeuten so gering, daß eine Reinigung des erhaltenen Körpers unmöglich war. Er gab nicht die charakteristische Eisenreaktion des Brenzcatechins, wohl aber starke Silberreduktion, färbte sich beim Stehen an der Luft und beim Erwärmen mit ganz verdünntem Alkali braun, doch ging die Braunfärbung nach einigen Tagen zurück.

Es findet sich wohl in der Literatur ein Hinweis auf einen Körper, das Ericinon, der neben Brenzcatechin vorkommt, und sich von ihm nur durch einen größeren Sauerstoffgehalt unterscheidet. Er wurde von *Uloth* aus den Blättern von *Arbutus uva ursi* dargestellt. Dieser Körper gab keine Eisenreaktionen, wohl aber Reduktion der *Fehling*schen Lösung, sehr starke Silberreduktion, Bräunung mit Alkalien, die, nachdem alles Ericinon zersetzt war, wieder verschwand. Man könnte immerhin vermuten, daß Ericinon ein Oxydationsprodukt des Brenzcatechin sei, analog wie das aus dem Guajacol von *Bertrand* dargestellte Tetraguajacohydrochinon. Doch waren bei der geringen Menge des Körpers, erhalten aus den Kulturen des B. mesentericus, weitere Untersuchungen nicht möglich.

Es erschien daher in diesem Falle zweckmäßiger, den Versuch zu machen, in der *Fränkel*schen Nährlösung selbst durch Farbenreaktionen Spuren von Brenzcatechin nachzuweisen, doch mußten vorher die vorhandenen Farbenreaktionen auf ihre Grenzen überprüft werden.

Es kamen folgende Reaktionen in Betracht:

1. *Die Reaktion mit 4 proz. Ferrichlorid.*

Diese erwies sich als unscharf wegen der gleichzeitigen Anwesenheit von Milchsäure in der *Fränkel*schen Lösung und auch nur bis zu einer Konzentration von 1 : 50 000 deutlich.

2. *Brenzcatechinnachweis nach G. Bayer.*

1 ccm der zu prüfenden Lösung, 1 ccm gesättigte Sulfanilsäure und 1 Tropfen Ferrichloridlösung (20 proz.) gaben bei höheren Brenzcatechinkonzentrationen Braunfärbung, bei einer Konzentration von 1 : 500 000 Gelbfärbung.

3. *P. Ehrlichs* Reagens.

---

*) Vgl. *Allain* und *Gaud* (Brenzcatechin in *Fehling*schen Lösungen nach Zuckerbestimmungen). — *Gautier* (Brenzcatechin und Protocatechusäure bei der Behandlung von Glucose mit Barythydrat bei 240°). — *Munk* (wahrscheinlich Brenzcatechin bei der Behandlung von Glucose mit Wasser bei 200°). — *Lippmann* (Brenzcatechin in Rübenrohzucker). — *Nencki* und *Sieber* (wahrscheinlich Brenzcatechin bei der Behandlung einer 5 proz. Dextroselösung mit 10% Natriumcarbonat).

Es besteht aus 2 Lösungen:

a) Einer 0,5 proz. Natriumnitritlösung,

b) einer 20fach verdünnten und mit Sulfanilsäure vollkommen gesättigten Salzsäure.

250 ccm der Sulfanilsäure gemischt mit 5 ccm der Nitritlösung bilden das Reagens. Gleiche Teile von der zu prüfenden Lösung und Reagens werden gemischt und auf einmal durch einen Überschuß von Ammoniak übersättigt. Das *Ehrlich*sche Reagens wirkt auf chemisch sehr verschiedene Körper [Mono-, Di- und Polyphenole, primäre und tertiäre Mono- und Diamine der aromatischen Reihe*)].

Von einer reinen Brenzcatechinlösung wurden Verdünnungen bis 1 : 500 000 gemacht. Je 1 ccm dieser Verdünnungen mit 1 ccm *Ehrlichs* Reagens gemischt und dann mit einer bestimmten Menge (ca. 0,1 ccm) Ammoniak alkalisch gemacht. Es trat eine rotbraune Färbung ein, die bei größerer Verdünnung farbenschwächer wurde. Bei der Verdünnung 1 : 500 000 trat eine eigelbe Färbung ein.

4. *Sanios Gerbsäurereagens.*

Verwendet wurden: 1 ccm der zu prüfenden Lösung (Brenzcatechin) und 1 Tropfen 1 proz. Kaliumbichromatlösung. Dieses Reagens zeigte sich auch nur bis zu Brenzcatechinkonzentrationen von 1 : 50 000 empfindlich.

5. *Brenzcatechinnachweis nach Arturo Rossi.*

„2—3 ccm einer Lösung von Brenzcatechin in konzentrierter Schwefelsäure werden mit 0,5 ccm einer 0,1 *proz.* resp. 0,001 *proz.* wässerigen Formaldehydlösung überschichtet. Im ersteren Falle entsteht ein *rotvioletter* Ring und eine weinrote Mischung, im zweiten Fall entsteht ein *rötlicher*, allmählich sich vertiefender Ring." 0,5 ccm Brenzcatechin (1 : 1000) wurden mit 3 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt und nach dem Abkühlen mit 0,5 ccm 0,1 proz. Formaldehydlösung überschichtet. Es entstand ein violetter Ring. Bei der Konzentration des Brenzcatechins von 1 : 100 000 versagt die Reaktion.

Außerdem färbt die konzentrierte Schwefelsäure die Zuckerlösung braun.

Die Methode scheint also für den Brenzcatechinnachweis in der Nährlösung nicht geeignet zu sein.

Von den obenerwähnten Reaktionen sind also die empfindlichsten die Reaktion nach *Bayer* mit Ferrichlorid und Sulfanilsäure sowie die mit *Ehrlichs* Reagens. Da aber das *Ehrlich*sche Reagens auch auf aromatische Mono- oder Diamine einwirkt, konnte es zum Brenzcatechinnachweis in den beimpften Nährlösungen nicht verwendet werden, da diese Eiweißabbauprodukte als Stoffwechselprodukte des Bakteriums enthielten.

Brenzcatechinnachweis in einer *unbeimpften* Nährlösung mit 2% *Milchzucker*, welche einige Zeit im Brutschrank gestanden hatte:

1 ccm dieser Nährlösung gibt mit 1 ccm Sulfanilsäure und 1 Tropfen 20 proz. Ferrichlorid einen leichten *braunen* Farbton, der weniger intensiv ist als die Reaktion mit einer Brenzcatechinlösung 1 : 200 000. Doch gibt 1 ccm Aqua destillata mit einem Tropfen 20 proz. Ferrichlorid und 1 ccm Sulfanilsäure behandelt eine gelbgrüne Färbung, in der der braune Farbton fehlt. Der Unterschied zwischen der Reaktion mit Aqua destillata und der mit der *Fränkel*schen Nährlösung ist ziemlich schwach. Doch gibt 1 Tropfen Milchsäure (Kahlbaum, $d = 1{,}21$) auf 1 ccm mit Aqua destillata verdünnt und analog behandelt eine Grünfärbung.

---

*) Siehe *E. Nickel*, Die Farbenreaktionen der Kohlenstoffverbindungen. Berlin 1888.

Es dürfte also die Milchsäure, welche die Nährlösung durch die Zugabe von Ammonium lacticum und andererseits durch die Alkalizersetzung des Zuckers enthält, die Reaktionsschärfe vermindern.

Eine mit derselben Nährlösung angestellte Reaktion nach *Ehrlich* gab folgendes Resultat:

1 ccm der Nährlösung mit 1 ccm *Ehrlichs* Reagens und 0,1 ccm Ammoniak versetzt ergab eine gelbe Färbung, die aber, gegen einen hellen Hintergrund gehalten, einen *grünlichen* Farbton zeigt. Der Farbton ist schwächer als bei einer Brenzcatechinverdünnung 1 : 200 000, stärker als 1 : 500 000. Zur Kontrolle wurde 1 Tropfen Milchsäure (Kahlbaum, $d = 1{,}21$) auf 1 ccm Aqua destillata verdünnt und damit die Reaktion angestellt; es entstand eine Grüngelbfärbung, die aber keinen braunen Farbton zeigt, so daß durch die Anwesenheit der Milchsäure in den Nährlösungen die Reaktionsschärfe vermindert wird.

Brenzcatechinnachweis in einer *Fränkel*schen Nährlösung mit 2% *Traubenzucker*:

Eine *Fränkel*sche Nährlösung, die 2% Traubenzucker enthielt, mit *Bacillus mesentericus niger* beimpft war, ca. 6 Wochen im Brutschrank gestanden hatte, und schwach alkalisch reagierte, wurde von den Bakterien abfiltriert, mit verdünnter Salzsäure ganz schwach angesäuert und zum Brenzcatechinnachweis verwendet.

0,5 ccm dieser Lösung wurden auf 1,5 ccm verdünnt, um die braune Färbung der Lösung möglichst abzuschwächen. Auf Zusatz von 1 ccm Sulfanilsäure entstand in der noch immer gelblich gefärbten Flüssigkeit eine merkliche *Bräunung*, die sich auf Zusatz von 1 Tropfen 20 proz. Ferrichloridlösung kaum merklich verstärkte. Die *Bräunung* war *intensiver* als die einer analog behandelten Brenzcatechinlösung mit der Konzentration 1 : 100 000. Vielleicht täuscht aber die Summation der Eigenfarbe mit der der Farbenreaktion einen höheren Brenzcatechingehalt vor.

Die Kontrolle, eine zu gleicher Zeit angesetzte *Fränkel*sche Nährlösung mit 2% Traubenzucker, die unbeimpft ca. 6 Wochen im Brutschrank gestanden hatte (leider waren in dieser Lösung Schimmelpilze gewachsen), war schwach gelblich gefärbt und reagierte schwach sauer. Sie gab mit den gleichen Teilen Aqua destillata verdünnt und mit Sulfanilsäure und 20 proz. Ferrichlorid versetzt eine *schwache Braungelbfärbung*.

Bei den 2 letzten Versuchen konnte das Reagens nach *P. Ehrlich* nicht verwendet werden, weil beide Flüssigkeiten Eiweißabbauprodukte von Bakterien bzw. von Pilzen enthielten.

Es wurden nun andere Reaktionen auf Brenzcatechin zur Bestätigung dieses Resultates versucht. Es kamen in Betracht die beiden von *Bayer* angegebenen Reaktionen zur Verschärfung des Brenzcatechinnachweises.

1. 1 ccm der zu prüfenden Lösung 1 ccm gesättigte Sulfanilsäure 1 Tropfen 2 proz. Natriumbichromatlösung	*Bayer* führt die Reaktion bei Kochhitze aus, ohne die Zeit der Kochdauer näher zu bezeichnen.

Bei der Brenzcatechinkonzentration

1 : 30 000 entsteht eine weinrote Farbe,
1 : 500 000 eine rosa Farbe,
1 : 1 000 000 eine gelbe Farbe (Chromatfarbe).

Diese Reaktion war jedoch in diesem Falle nicht gut brauchbar, da sie wohl bei höheren Brenzcatechinkonzentrationen eindeutige Resultate lieferte, jedoch bei sehr geringen Brenzcatechinkonzentrationen eine von der Kontrolle (1 ccm Aqua destillata, 1 ccm Sulfanilsäure, 1 Tropfen 2 proz. Natriumbichromatlösung) nur sehr wenig abweichende Farbentöne lieferte.

2. Die von *Bayer* modifizierte Fränkel-Allers-Reaktion zum Nachweis des Adrenalins:

2 ccm der zu prüfenden Lösung,
1 ccm gesättigte Sulfanilsäurelösung,
2 ccm $^{n}/_{1000}$-Kaliumbijodatlösung,
1 ccm 10 proz. Phosphorsäure.

Bayer erwärmt 60 Sekunden im kochenden Wasserbad. Da aber *Fränkel* beim Adrenalinnachweis das Reaktionsgemenge bis zum beginnenden Sieden erwärmt, so wurden die Röhrchen bei Anstellung der Probe 90 Sekunden im kochenden Wasserbad belassen, da es sich in der Nährlösung vermutlich um geringe Brenzcatechinmengen handelt. Bei der Konzentration von Brenzcatechin:

1 : 100 000 entsteht eine rötlich-gelbe Farbe,
1 : 500 000 eine rötlich-gelbe Farbe,
1 : 625 000 eine gelbe und
1 : 5 000 000 eine gelbliche Farbe.

Doch mißlang der Brenzcatechinnachweis in den beiden oberwähnten Nährlösungen nach dieser Methode, weil die Mesentericuskultur und die verschimmelte Nährlösung beide eiweißhaltig waren und ein Enteiweißen, ohne die Spuren von Brenzcatechin mitzureißen, schwer war.

Da nach dem Vorstehenden zu vermuten war, daß Brenzcatechin in Spuren in den Nährlösungen vorhanden war, wurde die Zucker- und Alkalikonzentration verstärkt, um den Brenzcatechinnachweis deutlicher zu machen. Es wurden *Fränkel*sche Nährlösungen bereitet, welche den gleichen Gehalt an Kaliumphosphat und Ammonlactat (dargestellt aus Milchsäure (Kahlbaum, $d = 1{,}21$) durch Neutralisation mit Ammoniak) wie die ursprüngliche *Fränkel*sche Nährlösung zeigten, dagegen wurde der Zucker in der Konzentration von 10% verwendet, während die Alkalinität 10% bzw. 20% und 40% Normalnatronlauge betrug.

Die Lösungen wurden zur Pasteurisation $1^1/_2$ Stunden bei 70° erhitzt.

Es zeigte die Nährlösung mit 10% *Traubenzucker* und 10% *Normalnatronlauge* nach einer halben Stunde leichte *Gelbfärbung*, die nach einer Stunde in *Gelbbraunfärbung* mit leichtem rötlichen Stich überging.

Die Nährlösung mit 10% *Traubenzucker* und 20% *Normalnatronlauge* zeigte nach einer halben Stunde *Gelbfärbung*, die nach einer Stunde in *Rotbraunfärbung* überging.

Die Nährlösung mit 10% *Traubenzucker* und 40% *Normalnatronlauge* zeigte nach einer halben Stunde starke *Rotbraunfärbung* und wurde nach einer Stunde *undurchsichtig*. Die Intensität der Färbungen in diesen Lösungen scheint also eine Funktion der Alkalinität zu sein.

Ein Teil der 2 Nährlösungen mit je 10% Traubenzucker und 10% resp. 20% Normalnatronlauge wurde mit Bacillus mesentericus niger beimpft. Der Bacillus wuchs in beiden Nährlösungen sehr üppig. In der ersteren Nährlösung schlug die ursprünglich *rötlichgelbe Farbe* in Rotbraun und Schwarzbraun um. In der zweiten Nährlösung verwandelte sich die rotbraune Farbe in einen *schwarzbraunen* Farbton.

Beide unbeimpften Nährlösungen wurden mit Salzsäure neutralisiert und zum Brenzcatechinnachweis verwendet.

Brenzcatechinnachweis in der Nährlösung mit 10% *Traubenzucker*, 10% *Normalnatronlauge* (4 g NaOH im Liter):

Die Nährlösung wurde bis nahezu zur Farblosigkeit, d. i. 15 fach, verdünnt.

Brenzcatechinnachweis mit *Sulfanilsäure* und 20 *proz. Ferrichlorid*:

1 ccm dieser 18fach verdünnten Nährlösung, 1 Tropfen 20 proz. Ferrichloridlösung und 1 ccm Sulfanilsäure gibt einen *gelben* Farbton mit grünem Stich. Wird eine 10fache Verdünnung der Nährlösung angewendet, so wird der Farbton bei analoger Behandlung etwas intensiver gelb. Auch dieses Reagens wurde auf reine Milchsäure (obiges Präparat) geprüft.

1 Tropfen Milchsäure (Kahlbaum, $d = 1{,}21$) wurde in 10 cm Aqua destillata verdünnt. 1 ccm dieser Verdünnung gibt mit 1 ccm Sulfanilsäure und einem Tropfen 20 proz. Ferrichloridlösung eine starke Grünfärbung. Dieses Reagens konnte, da die gelbbraune Farbe der Brenzcatechinreaktion durch die grüne Farbe, welche das Reagens mit der Milchsäure liefert, nur geschwächt wurde, immerhin angewendet werden.

Brenzcatechinnachweis mit *Kaliumbijodat* und *Phosphorsäure*:

2 ccm der 15fachen Verdünnung der Nährlösung,
1 ccm gesättigte Sulfanilsäurelösung,
2 ccm $^n/_{1000}$-Kaliumbijodatlösung,
1 ccm 10 proz. Phosphorsäurelösung

ergeben, 90 Sekunden im kochenden Wasserbad erwärmt, einen *schwach gelblichen* Farbton, der sich merklich von der Kontrolle, d. i. 2 ccm der 15fachen Verdünnung mit 4 ccm Aqua destillata behandelt, unterscheidet. 2 ccm der oben angeführten Milchsäureverdünnung wurden mit Kaliumbijodat, Phosphorsäure und Sulfanilsäure analog wie oben nach *Bayer* behandelt, doch trat keine Färbung ein.

Brenzcatechinnachweis in der Lösung mit 10% Traubenzucker und 20% Normalnatronlauge (8 *g NaOH im Liter*):

Die Nährlösung wurde bis nahezu zur Farblosigkeit (ca. 50fach) verdünnt.

Bei der Reaktion mit *Ferrichlorid* (20 proz.) und *Sulfanilsäure* erhält man mit 1 ccm der 50fachen Verdünnung der Nährlösung, 1 ccm Sulfanilsäure und 1 Tropfen 20 proz. Ferrichloridlösung eine merkliche *Gelbfärbung*. Doch wird auch hier die Reaktionsschärfe durch die Grünfärbung, welche die Milchsäure hervorruft, beeinträchtigt.

Brenzcatechinnachweis mit *Kaliumbijodat* und *Phosphorsäure*:

2 ccm der Nährlösung in 15facher Verdünnung liefern mit 2 ccm $^n/_{1000}$-Kaliumbijodatlösung, 1 ccm Sulfanilsäure und 1 ccm 10 proz. Phosphorsäure, 90 Sekunden im kochenden Wasserbad erhitzt, eine *rötlichgelbe* Farbe. Die Kontrolle, 2 ccm der Nährlösung in 15facher Verdünnung, ergeben mit 4 ccm Aqua destillata, 90 Sekunden im kochenden Wasserbad erhitzt, wohl eine *gelbliche* Farbe, die aber keinen rötlichen Stich hat und viel weniger intensiv ist als die der nach *Bayer* behandelten Nährlösung.

Ebenso zeigen 2 ccm der Nährlösung in 30facher Verdünnung, 2 ccm $^n/_{1000}$-Kaliumbijodatlösung, 1 ccm Sulfanilsäure, 1 ccm 10 proz. Phosphorsäure, 90 Sekunden im kochenden Wasserbad erwärmt, eine *rötlichgelbe* Farbe, die etwas gelbstichiger ist als eine gleichzeitig analog behandelte *Fränkel*sche Nährlösung, welcher *Brenzcatechin* in der Konzentration von ungefähr 1 : 200 000 zugesetzt war. Die Kontrolle mit Aqua destillata für die 30fache Verdünnung zeigte eine ganz *schwach gelbe* Farbe (siehe nebenstehende Tabelle).

Es ist also Brenzcatechin in beiden Nährlösungen in geringen Mengen enthalten.

Es wurde nun versucht, auch in *Fränkel*schen Nährlösungen, in denen einer geringere Zuckerkonzentration und dementsprechend eine geringere Alkalikonzentration war, das Brenzcatechin nachzuweisen.

Nährlösung	I.		II.	Kontrolle:	Kontrolle:	Grundfarbe
	Reaktion von Ferrichlorid (20%) und Sulfanilsäure auf die Nährlösung	Reaktion von Ferrichlorid (20 proz.) u. Sulfanilsäure auf Milchsäure (Kahlbaum, d = 1,21)	Reaktion mit Kaliumbijodat-Phosphorsäure und Sulfanilsäure auf der Nährlösung	Einwirkung des in II. verwendeten Reagens auf eine Nährlösung, der Brenzcatechin zugesetzt wurde	Einwirkung des in II. verwendeten Reagens auf Milchsäure (Kahlbaum d = 1,21)	der in gleicher Konzentration mit Aqua destill. verdünnten Nährlösung
*Fränkel*sche Nährlösung mit 10% Traubenzucker und 10% Normalnatronlauge	in 18facher Verdünnung: gelb in 10facher Verdünnung: intensiver gelb	grün	gelblich	Brenzcatechin in sehr geringer Konzentration gelb	farblos	nahezu farblos
*Fränkel*sche Nährlösung mit 10% Traubenzucker und 20% Normalnatronlauge	in 50facher Verdünnung: gelb *)	grün	in 15facher Verdünnung: rötlich-gelb in 30facher Verdünnung: rötlich-gelb	Konzentration des Brenzcatechins 1 : 200000 rötlichgelb	farblos	bei 15facher Verdünnung: schwach gelblich ohne rötlichen Stich bei 50facher Verdünnung: schwach gelblich

*) Um die gelbe Grundfarbe für die Anstellung der Reaktion mit Sulfanilsäure möglichst abzuschwächen.

Es wurden Nährlösungen bereitet, welche denselben Gehalt an Ammonlactat (bereitet aus Milchsäure Kahlbaum, $d = 1{,}21$, durch Neutralisation mit Ammoniak) und Kaliumphosphat aufwiesen, dagegen Traubenzucker in der Konzentration von 4 resp. 2%, und Normalnatronlauge in der Konzentration von 5 resp. 4, 3 und 2% enthielten. Die Lösungen wurden $1^1/_2$ Stunden zur Pasteurisation auf 75° erhitzt.

Die Nährlösungen mit 4% Traubenzucker und 5 resp. 4% Normalnatronlauge zeigten nach dem Pasteurisieren schwache Gelbfärbung, die nach dem Stehen im Brutschrank intensiver wurde.

Dagegen zeigten die Nährlösungen mit 2% Zucker nach dem Pasteurisieren und nach dem Stehen im Brutschrank keine stärkere Änderung der Farbe.

Ein Teil der Lösungen wurde beimpft.

Die Lösungen mit 4% *Traubenzucker* zeigen 8 *Tage*, nachdem sie mit Bacillus mesentericus niger beimpft worden waren, Braunfärbung unter Häutchenbildung des Bakteriums. Nach 6 Wochen intensive *Braunschwarzfärbung* der Nährlösung, während die unbeimpfte Kontrolle zur selben Zeit nur intensiv *gelb* gefärbt ist.

Die Nährlösung mit 2% *Traubenzucker* und 3% *Normalnatronlauge* zeigt *14 Tage*, nachdem sie beimpft worden war, eine *leichte Braunfärbung* unter Häutchenbildung des Bakteriums, nach 6 Wochen *intensive Braunfärbung*. Die unbeimpfte Kontrolle, welche gleiche Zeit im Brutschrank gestanden hatte, zeigte zur selben Zeit schwache *Gelbfärbung*.

Die Nährlösung mit 2% *Traubenzucker* und 2% *Normalnatronlauge*(also die ursprüngliche *Fränkel*sche Nährlösung) zeigt erst 3 *Wochen*, nachdem sie beimpft worden war, leichte *Braunfärbung* und Beginn einer Häutchenbildung. 6 Wochen später zeigte sie *intensive Braunfärbung*. Nach 10 Wochen war die Nährlösung *schwarzbraun* gefärbt und *undurchsichtig*. Sie reagierte *alkalisch*, während die Kontrolle, welche die gleiche Zeit unbeimpft im Brutschrank gestanden hatte, *schwach gelb* gefärbt war und *sauer* reagierte.

Da der Bacillus mesentericus niger auf der Nährlösung, welche 2% Zucker und 3% Normalnatronlauge enthält, rascher wächst als auf einer Nährlösung, welche bei gleicher Zuckerkonzentration einen geringeren Alkaligehalt besitzt, so ist es erklärlich, daß der Bacillus mesentericus niger auf der ursprünglichen *Fränkel*schen Nährlösung (2% Traubenzucker, 2% Normalnatronlauge) schlecht wächst. Daß Wachstum des Bakteriums auf der ursprünglichen *Fränkel*schen Nährlösung stattfindet, dürfte dadurch zu erklären sein, daß es Alkali bildet, wie aus der sauren Reaktion der unbeimpften *Fränkel*schen Nährlösung mit 2% Traubenzucker und 2% Normalnatronlauge gegenüber der alkalischen Reaktion derselben Nährlösung hervorgeht, wenn sie beimpft ist. — Es zeigt sich wieder, daß auch diese geringen Alkalikonzentrationen den Zucker unter Säurebildung zersetzen*).

*) Eine *Fränkel*sche Nährlösung mit 2% Traubenzucker und 2% Normalnatronlauge im Liter zeigte nach 4tägigem Stehen bei 37° neutrale oder schwach saure Reaktion, nach 14 Tagen verbrauchten 500 ccm dieser Nährlösung 6 ccm Normalnatronlauge zur Neutralisation; nach weiterem Zusatz von 10 ccm Normalnatronlauge blieb diese Nährlösung noch 6 Wochen später alkalisch. — Die Beobachtung, daß die Alkalieinwirkung auf Traubenzuckerlösung in der ersten Zeit bedeutender ist, wurde auch von *Nencki* und *Sieber* bei Anwendung größerer Alkali- und Zuckerkonzentrationen gemacht.

Ein Teil dieser Nährlösungen wurde zum Brenzcatechinnachweis verwendet.

Brenzcatechinnachweis in den unbeimpften Nährlösungen nach 14 Tage lanjem Stehen im Brutschrank:

Brenzcatechinnachweis in der Nährlösung mit 4% Traubenzucker und 5% Normalnatronlauge (2 g NaOH im Liter). 1 ccm dieser Nährlösung gab mit dem *Bayer*schen Reagens (1 ccm Sulfanilsäurelösung (frisch bereitet), 2 ccm $^{n}/_{1000}$-Kaliumbijodatlösung, 1 ccm 10 proz. Phosphorsäure) und 1 ccm Aqua destillata, 90 Sekunden im kochenden Wasserbad erhitzt, eine deutliche *gelbe* Farbe; doch gab die Kontrolle, 1 ccm derselben Nährlösung mit 5 ccm Aqua destillata, 90 Sek. im kochenden Wasserbad erhitzt, eine gelbliche Färbung mit braunem Ton. Nun wurde die gleiche Nährlösung mit $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure schwach angesäuert und 1 ccm davon mit 5 ccm Aqua destillata 90 Sekunden im kochenden Wasserbad erwärmt. Es entstand eine viel weniger intensive Gelbfärbung als bei der schwach alkalischen Kontrolle, so daß die Gelbfärbung in der Reaktion nach *Bayer* sich durch ihre Intensität deutlich von der sauren Kontrolle unterscheidet.

Es ist anzunehmen, daß die Gelbbraunfärbung in der schwach alkalischen Kontrolle von der durch das Erhitzen vor sich gehenden Zuckerzersetzung herrührt. Der Versuch wurde mit einer geringeren Konzentration der Nährlösung bei gleicher Konzentration des Reagens wiederholt.

0,5 ccm derselben Nährlösung und 0,5 ccm Aqua destillata gaben mit dem *Bayer*schen Reagens (1 ccm Sulfanilsäurelösung, 2 ccm $^{n}/_{10}$-Kaliumbijodatlösung, 1 ccm 10 proz. Phosphorsäure) 90 Sekunden im kochenden Wasserbad erhitzt, eine deutliche *Gelbfärbung*, während die Kontrolle: 0,5 ccm der Nährlösung mit 4,5 ccm Aqua destillata *farblos* oder *schwach gelblich* gefärbt war.

Brenzcatechinnachweis in der Nährlösung mit 2% Traubenzucker und 3% Normalnatronlauge (1,2 g NaOH im Liter). 1 ccm dieser Nährlösung und 1 ccm Aqua destillata geben mit dem *Bayer*schen Reagens (1 ccm Sulfanilsäure, 2 ccm $^{n}/_{1000}$-Kaliumbijodatlösung, 1 ccm 10 proz. Phosphorsäure) 90 Sekunden im kochenden Wasserbad erhitzt, eine *Gelbfärbung*, die der Farbe sehr ähnlich ist, welche die 15 fach verdünnte *Fränkel*sche Nährlösung mit 10% Traubenzucker und 10% Normalnatronlauge nach *Bayer* behandelt gibt.

Die Kontrolle: 1 ccm der Nährlösung mit 2% Traubenzucker und 3% Normalnatronlauge, gibt mit 5 ccm Aqua destillata 90 Sekunden im kochenden Wasserbad erhitzt, gleichfalls eine gelbbraune Farbe.

Bei verminderter Konzentration der Nährlösung und gleicher Konzentration des Reagens hatte die Reaktion folgendes Ergebnis:

0,5 ccm der Nährlösung mit 2% Traubenzucker und 3% Normalnatronlauge zeigten mit 0,5 ccm Aqua destillata und dem *Bayer*schen Reagens (1 ccm Sulfanilsäure, 2 ccm $^{n}/_{1000}$-Kaliumbijodatlösung, 1 ccm 10 proz. Phosphorsäure), 90 Sekunden im kochenden Wasserbad erhitzt, eine *Gelbfärbung*, während die dazugehörige Kontrolle (die Nährlösung in derselben Konzentration mit Aqua destillata verdünnt) nahezu *farblos* war.

Brenzcatechinnachweis in der Nährlösung mit 2% Traubenzucker und 2% Normalnatronlauge (0,8 g NaOH im Liter) (gleiche Konzentration, verminderter Alkaligehalt). 1 ccm dieser Nährlösung und 1 ccm Aqua destillata geben mit dem *Bayer*schen Reagens (1 ccm Sulfanilsäurelösung, 2 ccm $^{n}/_{1000}$-Kaliumbijodatlösung, 1 ccm 10 proz. Phosphorsäure), 90 Sekunden im kochenden Wasserbad erhitzt, eine *gelbe Farbe* mit *rötlichem Stich*, welche sehr ähnlich ist der Farbe einer analog behandelten Nährlösung, welcher Brenzcatechin in einer Konzentration von ca. 1 : 500 000 zugesetzt war.

Die Kontrolle: 1 ccm der Nährlösung mit 2% Traubenzucker und 2% Normalnatronlauge und 5 ccm Aqua destillata war nach 90 Sekunden langem Erhitzen im Wasserbad *farblos* oder schwach gelblich.

Brenzcatechinnachweis in den oberwähnten Nährlösungen mittels *Sulfanilsäure* und 20 *proz. Ferrichlorid* (die Nährlösungen wurden vorher ganz schwach angesäuert)

1 ccm der Nährlösung mit 4% Traubenzucker und 5% Normalnatronlauge gibt mit 1 ccm Sulfanilsäurelösung, 1 Tropfen 20 proz. Ferrichloridlösung eine *Gelbfärbung*, die einen grünen Stich zeigt.

1 ccm der Nährlösung mit 2% Zucker und 3% Normalnatronlauge gibt mit 1 ccm Sulfanilsäurelösung, 1 Tropfen 20 proz. Ferrichloridlösung eine etwas schwächere *Gelbfärbung* mit grünlichem Stich.

1 ccm der Nährlösung mit 2% Traubenzucker und 2% Normalnatronlauge gibt mit 1 ccm Sulfanilsäurelösung, 1 Tropfen 20 proz. Ferrichloridlösung eine intensivere *Gelbfärbung*. Diese unterscheidet sich ein wenig durch einen grünen Farbton von der Färbung einer Nährlösung, welcher Brenzcatechin in einer Konzentration von ungefähr 1 : 500 000 zugesetzt worden war.

Zur Kontrolle wurde 1 ccm einer reinen, sehr stark verdünnten Brenzcatechinlösung mit 1 Tropfen Milchsäure (Kahlbaum, $d = 1{,}21$) versetzt. Nach Zusatz von 1 ccm Sulfanilsäure und 1 Tropfen 20 proz. Ferrichloridlösung entstand eine Grüngelbfärbung, die der Färbung sehr ähnlich ist, welche die Nährlösung mit 4% Traubenzucker und 5% Normalnatronlauge bei der Reaktion mit Sulfanilsäure und Ferrichlorid gibt (vgl. Tabelle).

Es dürften also auch in den Nährlösungen mit geringerem Zucker- und Alkaligehalt in sehr geringen Mengen Konzentrationen von Brenzcatechin vorhanden sein, aller Wahrscheinlichkeit nach unter 1 : 200 000.

Da aber reine Brenzcatechinlösung in der Konzentration 1 : 100 000 oder 1 : 200 000 sich beim Stehen an der Luft und auch im Brutschrank nicht merklich verändert, so konnte die braune Farbe der beimpften Nährlösung unter der Voraussetzung, daß Brenzcatechin der farbbildende Bestandteil ist, dadurch entstehen, daß nach und nach eine Anreicherung der Oxydationsprodukte des Brenzcatechins in der Nährlösung stattfand, bis die Braunfärbung entstand.

Doch war auch zu versuchen, wie die organischen Derivate des Ammoniaks (die Amine und Aminosäuren), welche beide im Stoffwechsel auftreten können, mit dem Brenzcatechin reagieren. Zu diesem Zweck wurde von Glykokoll, Tyrosin, Leucin eine Lösung von 1 : 1000 mit 20 ccm Normalnatronlauge im Liter bereitet, von Glycyltryptophan (Fermentdiagnosticum Kalle & Co., Biebrich), eine Lösung von 1 : 500 mit dem gleichen Alkaligehalt hergestellt.

Es wurden Versuche mit Brenzcatechin in der Konzentration 1 : 10 000 und 1 : 100 000 angestellt, wobei sich folgende Ergebnisse zeigten:

Es wurden verwendet:

Brenzcatechin 1 : 10 000	1 ccm
Alkalisalzlösung der Aminosäure . . .	1 ccm

Bei *gewöhnlicher* Temperatur war die Kontrolle: 1 ccm Brenzcatechin 1 : 10 000, 1 ccm Aqua destillata und 0,02 ccm Normalnatronlauge am intensivsten gefärbt, und zwar *hellbraun*.

Nährlösung	I.			II.				
	Einwirkung von Ferrichlorid (20%), und Sulfanilsäure auf die Nährlösung	Einwirkung von Ferrichlorid (20%) und Sulfanilsäure auf Milchsäure (Kahlbaum, d = 1,21)	Einwirkung von Ferrichlorid (20%) und Sulfanilsäure auf ein Gemisch von sehr verdünnter Milchsäure und stark verdünntem Brenzcatechin	Einwirkung von Kaliumbijodat, Phosphorsäure und Sulfanilsäure auf die *Fränkel*sche Nährlösung	Einwirkung des in II verwendeten Reagens auf die Nährlösung der Brenzcatechin in geringen Konzentrationen zugesetzt worden war	Einwirkung des in II verwendeten Reagens auf Milchsäure (Kahlbaum, d = 1,21)	Kontrolle: a) schwach alkalisch, *Fränkel*sche Nährlösung in der gleichen Konzentration mit Aqua destill. verdünnt	Kontrolle: b) schwach sauer, *Fränkel*sche Nährlösung in der gleichen Konzentration mit Aqua destill. verdünnt
*Fränkel*sche Nährlösung mit 4% Traubenzucker und 5% Normalnatronlauge	gelb mit grünem Stich	grün	gelb mit grünem Stich	gelb bei vermind. Konzentrat. d. Nährlösung und gleicher Konzentrat. des Reagens gelb	gelb	farblos	gelbbraun nahezu farblos	schwach gelblich
*Fränkel*sche Nährlösung mit 2% Traubenzucker und 3% Normalnatronlauge	dgl.	dgl.	dgl.	gelb bei vermind. Konzentrat. d. Nährlösung und gleicher Konzentrat. des Reagens gelb	dgl.	dgl.	gelbbraun nahezu farblos	
*Fränkel*sche Nährlösung mit 2% Traubenzucker und 2% Normalnatronlauge	gelbbraun	dgl.	dgl.	gelb mit rötlichem Einschlag	Brenzcatechin i. d. Konz. 1 : 500 000 gelb mit rötlichem Einschlag	dgl.		farblos*)

*) Die Nährlösung reagierte schwach sauer.

Sodann wurden die Röhrchen eine Stunde bei 70° erhitzt und am nächsten Tag beobachtet. Am intensivsten war das Röhrchen mit Glykokoll gefärbt (*hellbraun*), weniger stark die Röhrchen mit Tyrosin und Glycyltryptophan, schwächer noch das Leucinröhrchen und die alkalische Brenzcatechinlösung.

Die Kontrollen, je 1 ccm Alkalisalzlösung der Aminosäuren und 1 ccm Aqua destillata zeigten bei gleicher Behandlung keine Färbung bis auf das Glycyltryptophan, welches eine ganz leichte Gelbfärbung aufwies.

Nun wurde die Brenzcatechinkonzentration vermindert:

1 ccm Brenzcatechin 1 : 100 000
1 ccm Alkalisalzlösung der Aminosäuren

wurden 1 Stunde bei 70° erhitzt. Hier zeigte die intensivste Färbung das Tyrosinröhrchen (*braun*), weniger intensive Farbe das Glykokollröhrchen (*hellbraun*), noch schwächer gefärbt waren die alkalische Brenzcatechinlösung und die Röhrchen mit Glycyltryptophan und Leucin.

Es wurden nun die Brenzcatechin und zugleich die Konzentration der Aminosäuren vermindert.

Brenzcatechin 1 : 100 000	0,5 ccm
Alkalisalzlösung der Aminosäuren .	0,1 ccm
Aqua destillata	0,4 ccm

wurden 1 Stunde bei 70° erhitzt. Hier war am intensivsten das Röhrchen mit Tyrosin gefärbt (*schwach hellbraun*), weniger intensiv das Röhrchen, welches Glykokoll enthielt, noch schwächer das Röhrchen mit Glycyltryptophan, die alkalische Brenzcatechinlösung und das Leucinröhrchen.

Der Versuch wurde in analoger Weise wiederholt, doch wurden nur Bruttemperaturen (37°) angewendet. Die Versuche wurden mit Brenzcatechinlösung 1 : 10 000 und 1 : 100 000 angestellt und zuerst bei *gewöhnlicher* Temperatur, dann nach 2tägigem Stehen im *Brutschrank* beobachtet.

1 ccm Brenzcatechin 1 : 10 000 wurden mit 1 ccm Alkalisalzlösung der Aminosäure (resp. Amin) versetzt. Beim Zusammengießen der Alkalisalzlösung der Aminosäure mit der Brenzcatechinlösung entsteht eine Rosafärbung, die in ca. 1 Stunde in Gelb umschlägt. Auch die Brenzcatechinlösung 1 : 10 000 wird, mit 0,02 ccm Normalnatronlauge und 1 ccm Aqua destillata versetzt, rosa gefärbt; die Färbung geht aber dann rasch in Braungelb über. Die Röhrchen sind ungefähr gleich stark, eher schwächer gefärbt als die alkalische Brenzcatechinlösung. Nach 2 Tage langem Stehen im Brutschrank waren am intensivsten gefärbt das Glykokollröhrchen (*braun*), weniger intensiv das Tyrosinröhrchen (*gelbbraune Farbe*), noch schwächer die Röhrchen mit Phenyläthylamin, alkalischer Brenzcatechinlösung, Trimethylamin, Glycyltryptophan und Leucin. Nun wurde die Konzentration des Brenzcatechins und der Aminosäuren wieder vermindert, und zwar wie folgt:

Brenzcatechin 1 : 100 000	0,5 ccm
Alkalisalzlösung der Aminosäuren (resp. Amin.) .	0,1 ccm
Aqua destillata	0,4 ccm

Bei gewöhnlicher Temperatur war das Glykokollröhrchen am intensivsten gefärbt, weniger intensiv das Tyrosinröhrchen, noch schwächer das Leucinröhrchen, die Röhrchen mit Glycyltryptophan, Trimethylamin, Phenyläthylamin, während die alkalische *Brenzcatechinlösung* nahezu *farblos* war. Nach 2 Tage langem Stehen im Brutschrank zeigte das Glykokollröhrchen die intensivste Farbe (*gelb*), schwächer gelb gefärbt waren die Röhrchen mit Tyrosin, Phenyläthylamin, Trimethylamin, Glycyltryptophan und Leucin, und fast ganz *farblos* war wieder die alkalische *Brenzcatechinlösung*.

Da sich auch eine *Fränkel*sche Nährlösung, die statt Traubenzucker Tyrosin enthält, nach dem Beimpfen bräunt, so war es naheliegend, die Einwirkung der Aminosäuren auch auf Hydrochinon zu untersuchen, indem ja durch Abbau des Tyrosins ein Derivat des Hydrochinons entstehen konnte.

Es wurde je 1 ccm einer Hydrochinonlösung 1 : 10 000 mit 1 ccm der Alkalisalzlösung der Aminosäuren versetzt. Zur Kontrolle wurde 1 ccm Hydrochinonlösung (in der Konzentration 1 : 10 000) mit 1 ccm Aqua destillata und 0,02 ccm Normalnatronlauge versetzt. Es trat in allen Röhrchen intensive Gelbfärbung ein, die aber sofort abblaßte und nur im Glykokollröhrchen einer rotvioletten Farbe wich.

Nach 20 Stunden langem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur war das Röhrchen mit Glykokoll *rotbraun* gefärbt, das mit Tyrosin und Leucin war rotbraun, aber schwächer, gefärbt, das Röhrchen mit Glycyltryptophan war gelbrötlich gefärbt, die alkalische *Hydrochinonlösung* jedoch zeigte *gelbe* Farbe. Nach 14 Tage langem Stehen im Brutschrank war das Röhrchen mit *Glykokoll rotbraun* gefärbt, etwas schwächer *rotbraun* das Röhrchen mit *Tyrosin*, schwach *rotbraun* das Röhrchen mit *Leucin, gelbrötlich* das Röhrchen mit *Glycyltryptophan*, die alkalische *Hydrochinon*lösung aber war *gelb* mit schwach rötlichem Einschlag.

Die Aminosäuren zeigen also farbverstärkende Wirkung bei der Färbung stark verdünnter alkalischer Lösungen von Brenzcatechin und Hydrochinon. Das Hydrochinon reagiert mit den Aminosäuren noch intensiver als das Brenzcatechin. Diese farbverstärkende Wirkung dürfte durch Entstehen von Kondensationsprodukten aus Aminosäuren und den beiden Dioxybenzolen zu erklären sein. Diese Annahme gewinnt an Wahrscheinlichkeit, wenn man daran denkt, daß die Kondensation über die Bildung von Derivaten des Pseudoindoxyls gehen könnte.

Zusammenfassung.

Der Bacillus mesentericus var. niger wächst auf Nähragar ohne Zusätze von Kohlenhydraten, mehrwertigen Alkoholen oder Aminosäuren, welche Benzolderivate sind, ohne die Farbe des Nährbodens wesentlich zu verändern, während er auf Nährböden mit derartigen Zusätzen (Dextrose, Mannose, Galaktose, Lävulose, Lactobiose, Saccharose, Glycerin, Dulcit, Mannit, Tyrosin) unter Dunkelfärbung des Nährbodens wächst (für Kohlenhydrate von *Biel* und *Lunt* beobachtet). Unter Zuhilfenahme eiweißfreier Nährmedien wurde gezeigt, daß die Schwarzfärbung durch Körper der Benzolreihe bedingt ist, welche den Dioxybenzolen (o- und p-Verbindungen) nahestehen und wahrscheinlich Kondensationsprodukte dieser mit Aminosäuren bilden. Daraus dürfte sich die farbverstärkende Wirkung besonders der Aminosäuren und auch der Amine bei der Zusammenwirkung mit Brenzcatechin und Hydrochinon erklären.

Diese Tatsachen wurden zum Teil durch eigene Versuche belegt (Verwendung verschiedener Zusätze zu Nährböden und Beobachtung der Beschleunigung der Farbstoffbildung — Nachweis von Brenzcatechin als Umwandlungsprodukt verdünnter, schwach alkalischer

Zuckerlösungen — Beobachtung der farbverstärkenden Wirkung von Aminosäuren resp. Aminen bei der Oxydation sehr verdünnter Brenzcatechinlösungen), zum Teil durch Literaturstudien gestützt. (Nachweis von Brenzcatechin und Milchsäure in alkalischen Zuckerlösungen durch *Allain* und *Gaud*, *Nencki* und *Sieber*, *Gautier* u. a. m.)

Der ganze Vorgang der Schwarzfärbung kohlenhydrathaltiger Nährböden durch die Wirksamkeit des Bacillus mesentericus niger läßt sich nach dem Gesagten als fermentative Beschleunigung (Beweis durch Fermentnachweis) eines im Nährboden unter den gegebenen Bedingungen spontan ablaufenden Vorganges auffassen, dessen einzelne Phasen chemisch etwa folgendermaßen zu charakterisieren sind: In alkalischen Zuckerlösungen kann aus Zucker durch Alkali bei 37° Milchsäure abgespalten werden (*Nencki* und *Sieber*, *Allain* und *Gaud* u. a.). Daneben bilden sich außer anderen organischen Säuren auch aromatische Körper (Protocatechusäure, *Gautier*, Brenzcatechin, *Allain* und *Gaud*, Dioxyphenylpropionsäure, *Allain* und *Gaud*). Bei hoher Temperatur oder durch kräftige Alkalieinwirkung kann die Bildung dunkler Oxydationsprodukte aus den durch die Zersetzung entstandenen Dioxybenzolen erreicht werden. — Bei 37° und mäßiger Alkalieinwirkung tritt spontan keine Dunkelfärbung ein. Die Wirkung des Bacillus mesentericus niger bewirkt letzten Endes nicht eine einfache Oxydation der Dioxybenzole, sondern folgende Veränderungen des Mediums, durch welche die Schwarzfärbung der Dioxybenzole gefördert wird. Einerseits wird die Neutralisation der alkalischen Zuckerlösung durch die sich spontan abspaltenden organischen Säuren dadurch verhindert, daß Alkali gebildet wird, so daß die Lösung genügend lang alkalisch bleibt; andererseits entstehen im Nährmedium Amine und Aminosäuren durch die kräftige Reduktionswirkung des Bacillus, welche die Dunkelfärbung stark verdünnter Lösungen von Dioxybenzolen (insbesondere der p-, auch der o-Verbindungen) bewirken (Bildung von Kondensationsprodukten ?).

Literatur.

Abderhalden und *Teruuchi*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**, 226. — *Abderhalden* und *Guggenheim*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **54**, 331. — *Allain* und *Gaud*, Journ. de Pharm. et de Chim. **30**, 300. 1895. — *Bayer*, diese Zeitschr. **20**. 1909. — *Bertrand*, Ann. de l'inst. Pasteur **18**, 116. 1904. — *Biel*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. **2**, 2. 1896. — *Gautier*, Bull. de la soc. chim. de France (2) **31**, 530. — *Lippmann*, B. **20**, 3298. — *Lunt*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. **2**, 2. 1896. — *Meisenheimer*, B. **41**, 1009. — *Munk*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **1**, 362. — *Nencki* und *Sieber*, Journ. f. prakt. Chem. **2**, 24. 1881; **2**, 26. 1882. — *Nickel, E.*, Die Farbenreaktionen der Kohlenstoffverbindungen. Berlin 1888. — *Rossi, Arturo*, Ch. C. **1919**. III. 857. — *Schmiedeberg*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **14**, 305. — *Schulze*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Orig. **56**, 544. — *Uloth*, Liebigs Ann. d. Chem. **111**. 1859.

Über eine Reaktion des Harnstoffes mit p-Dimethylamidobenzaldehyd.

I. Mitteilung[1]).

Von

H. K. Barrenscheen und **O. Weltmann.**

(Aus dem Med.-chemischen Institut und der III. Med. Klinik der Universität Wien.)

(Eingegangen am 8. Mai 1922.)

Versetzt man stark verdünnten normalen Harn — bei niedrig gestelltem Harn kann auch der unverdünnte verwendet werden — mit einigen Tropfen Aldehydreagens nach *P. Ehrlich* (p-Dimethylamidobenzaldehyd in salzsaurer Lösung), so tritt momentan eine mehr minder intensive zeisiggrüne Färbung auf, die bei einigem Stehen noch zunimmt. Über diese Farbreaktion hat der eine von uns in der Sitzung der Gesellschaft für innere Medizin und Kinderheilkunde vom 16. VI. 1921[2]) kurz berichtet, ohne damals eine Erklärung dafür geben zu können. Diese Reaktion, die merkwürdigerweise bis dahin übersehen wurde, tritt in allen Harnen, auch nach Entfärbung mit Tierkohle, auf. Es kann sich demnach nur um einen normalen Harnbestandteil handeln, der an dieser Farbstoffbildung beteiligt ist. Wir sind der Reaktion nun systematisch nachgegangen und konnten feststellen, daß es der *Harnstoff* ist, der sie bedingt.

Kein anderer normaler Harnbestandteil gibt die Reaktion. Untersucht wurden Harnsäure, Purinbasen (Xanthin, Guanin usw.) und deren Abkömmlinge, das Guanidin und die Guanidinderivate Kreatin und Kreatinin, eine Reihe von Aminosäuren, carbaminsaure Salze, Ammonsalze. Keiner dieser Körper zeigt die Reaktion. Eine Ausnahme macht einzig das Allantoin, doch soll auf diese Verhältnisse in einer späteren Arbeit eingegangen werden.

---

[1]) In einer soeben erschienenen Arbeit (Klin. Wochenschr. 1922, H. 18) beschreibt *Meyer-Estorf* als „grüne Benzaldehydreaktion" diese von uns seit längerer Zeit schon festgestellte Harnstoffreaktion. (*Meyer-Estorf* nimmt als Träger der Reaktion vermutungsweise einen Körper der Indolreihe an). Wir sehen uns daher veranlaßt, diesen Teil unserer Arbeit, der vor allem die praktische Verwendung der Reaktion beinhaltet, schon jetzt zu veröffentlichen.

[2]) *Weltmann* und *Tenschert*, Wien. med. Wochenschr. 1922, H. 18.

Prüft man die Reaktion mit reinen Harnstofflösungen, so läßt sich zeigen, daß sie eine relativ hohe Empfindlichkeit besitzt. Geht man von 10 ccm einer 0,01 mol. Harnstofflösung aus und stellt in einer arithmetischen Reihe Verdünnungen mit der Differenz von 0,5 ccm her, so läßt sich zeigen, daß die Reaktion noch bei dem 19. Glied der Reihe, entsprechend einer 0,001 mol. Verdünnung, deutlich positiv ist. Bei einer 0,0005 mol. Verdünnung fällt die Probe negativ aus. Nehmen wir die 0,001 mol. Lösung als oberste Grenze, so entspricht das einer Verdünnung von 1 : 16 666, mit anderen Worten, es lassen sich durch die Reaktion noch 0,6 mg Harnstoff in 10 ccm bzw. 0,06 mg in 1 ccm nachweisen. Wie die Verhältnisse der Empfindlichkeit im Harne liegen, darüber haben wir vorläufig noch keine Erfahrung. Wir wissen nur, daß normaler Harn in 200—1000 facher Verdünnung die Reaktion noch erkennen läßt. Für das mit Trichloressigsäure enteiweißte Serum konnten wir eine wesentlich geringere Empfindlichkeit der Reaktion erweisen als den angeführten Zahlen, die sich auf wässerige Lösungen reinen Harnstoffes beziehen, entspricht.

Die Reaktion mit reinem Harnstoff läßt sich auch in alkoholischer Lösung durchführen. Wesentlich für ihr Zustandekommen ist nur die Gegenwart von freien $H^{\cdot}$-Ionen. Versetzt man eine alkoholische Harnstofflösung mit einer Auflösung des Aldehyds in Alkohol, so tritt nach Zusatz von freier Säure die intensiv gelbgrüne Färbung auf. Die Natur des Säureanions scheint vollkommen gleichgültig zu sein. Wir verwendeten gasförmige und konzentriert wässerige HCl, ferner HNO_3, H_2SO_4, H_3PO_4, Eisessig mit dem gleichen Erfolg. Zusatz von 40 proz. Formaldehydlösung im Überschuß hemmt die Reaktion im Gegensatz zur Urobilinogenprobe nicht. Durch Alkali wird die Färbung unter gleichzeitiger Fällung des Aldehyds zerstört. Über den Chemismus der Reaktion sind Untersuchungen des einen von uns im Gange und stehen vor ihrem unmittelbaren Abschluß.

Abgesehen von dem theoretischen Interesse kommt der Reaktion auch praktische Bedeutung zu. Wir haben unsere Untersuchungen nach Sicherstellung des Harnstoffes als Träger der Farbstoffbildung zunächst auf den Harnstoffnachweis im Serum gerichtet und sind dabei zu Ergebnissen gekommen, die in Tabelle I zusammengestellt sind. Unsere Untersuchungen erstrecken sich bis jetzt auf 45 Fälle, darunter 4 Fälle von chronischer Nephritis mit schwerer Azothämie. In sämtlichen Fällen wurde der Rest-N nach der *Pregl*schen Mikro-Kjeldahlmethode unter Verwendung von 2 ccm des Filtrates der Trichloressigsäurefällung, entsprechend 1 ccm Serum, bestimmt. Die parallel durchgeführte Aldehydreaktion wurde mit 1 ccm des Filtrates und 2 Tropfen des Reagens angestellt; doch läßt sich die Probe einwandfrei auch mit geringeren Mengen Serumfiltrates durchführen. In allen Fällen, bei

Tabelle I.

Fall Nr.	Klinische Diagnose	Rest-N mg-%	Aldehyd-reaktion	Fall Nr.	Klinische Diagnose	Rest-N mg-%	Aldehyd-reaktion
1	Carcinom d. Gallenblase	19	—	24	Schwangerschaftsnephritis	40	±
2	Sekund. Schrumpfniere	252	+ + +	25	Apicitis	25	—
3	Nephrose	23	—	26	Cystitis	28	—
4	Genuine Schrumpfniere	54	+	27	Neurose	34	—
5	Chron. Bronchitis	22	—	28	Jcterus catarrhalis	24	—
6	Akute diffuse Glomerulonephritis	41	+	29	Benigne Nephrosklerose	41	±
7	Cysto-pyelonephrit.	41	+	30	Combustio	31	—
8	Blande Hypertonie	39	±	31	Scrophuloderma	23	—
9	Sekund. Schrumpfniere	184	+ + +	32	Lupus erythematodes	27	—
10	Benigne Nephrosklerose	62	+ +	33	Lupus vulgaris	26	—
11	Lues cerebrospinalis	19	—	34	Trichophytie	41	+
12	Blande Hypertonie	36	±	35	Akute diffuse Glomerulonephritis	37	±
13	" "	29	—	35a	Dieselbe, 2 Stunden nach Eingabe von 10 g Harnstoff	56	+ +
14	Tumor abdominis	36	±	36	Vitium cordis	24	—
15	Pyelitis	17	—	37	Akute diffuse Glomerulonephritis	59	+ +
16	Tabes dorsalis	31	—	38	Multiple Sklerose	26	—
17	Kyphoskoliose	23	—	49	Pleuritis exudativa	30	—
18	Sekund. Schrumpfniere	119	+ + +	40	Arteriosklerose	38	±
19	Akute diffuse Glomerulonephritis	29	—	41	Apicitis	23	—
20	Gastritis chronica	22	—	42	Carcinoma ventriculi	22	—
21	Bronchiektasie	20	—	43	Schrumpfniere	105	+ + +
22	Mitralsten., Hypertonie	38	±	44	Benigne Nephrosklerose	35	± ?
23	Mitralstenose	31	—	45	Subakute Nephritis	46	+

denen ein Rest-N über 36—40 mg-% gefunden wurde, fiel die Reaktion positiv aus. Diese Grenzwerte zeigen gegen Kontrollproben einen deutlich grünlichgelben Stich, bei hohem Rest-N tritt eine intensive grüngelbe Färbung auf. Die Unterschiede im Ausfall der Reaktion sind in der Tabelle durch die Bezeichnung ± — + + + angegeben. Sie sind so deutlich, daß eine Schätzung des Harnstoff- bzw. Reststickstoffgehaltes möglich ist. Wir konnten uns bei getrennt durchgeführter Aldehydreaktion und Rest-N-Bestimmung immer wieder davon überzeugen, daß die schätzungsweise Angabe der Rest-N-Vermehrung mit den tatsächlich gefundenen Zahlen eine genügende Übereinstimmung zeigt. Praktisch kommt der Reaktion zugute, daß ihre Grenze im Trichloressigsäurefiltrat des Serums mit der als normal angesehenen Schwelle des Rest-N fast genau zusammenfällt. Überblickt man die Literaturangaben über den Rest-N-Gehalt beim Normalen, so finden wir bei

Bang[1]) Werte zwischen 190—390 mg-$^0/_{00}$, im Durchschnitt 250 mg-$^0/_{00}$ bei *Gettler* und *Baker*[2]) 300—450 mg-$^0/_{00}$, nach *Folin*[3]) 280—300, maximal 417 mg-$^0/_{00}$; nach den Untersuchungen von *F. S. Hammett*[4]) aus der letzten Zeit den durchschnittlichen Wert von 351 mg-$^0/_{00}$. Von diesem Rest-N entfallen ca. 50% auf den Harnstoff, nach *Hammett* rund 171 mg-$^0/_{00}$. Nehmen wir 350 mg-$^0/_{00}$ als normalen Durchschnittswert des Reststickstoffs, so zeigt sich, daß der positive Ausfall der Aldehydreaktion schon eine Erhöhung der normalen Harnstoffwerte anzeigt. Da die Vermehrung des Rest-N zum größten Teil durch eine Retention von Harnstoff bedingt ist, findet auch der starke Ausfall der Probe bei den höheren Graden der Rest-N-Vermehrung seine Erklärung. Dadurch gewinnt unzweifelhaft die praktische Bedeutung der Probe.

Sie versetzt uns in die Lage, uns durch einfache qualitative Reaktion über den Harnstoffgehalt des Serums rasch und einwandfrei zu orientieren und dürfte auch dem praktischen Arzte nützlich sein, da sie ein Auskommen mit geringen Blutmengen gestattet und keinerlei Laboratoriumseinrichtung oder technisches Können voraussetzt.

Auffallend ist, daß im Serum bei der von uns geübten Methode der Enteiweißung mit Trichloressigsäure der Schwellenwert für den positiven Ausfall der Probe weit tiefer liegt als bei reinen Harnstofflösungen. Während diese noch einen positiven Ausfall der Probe bei einer Verdünnung von 6 mg auf 100 ccm Wasser ergaben, liegt hier die oberste Grenze bei einer Verdünnung, die rund 40 mg Harnstoff in 100 ccm entspräche. Untersuchungen, welche dieses verschiedene Verhalten aufklären sollen, sind im Gange, ebenso Versuche, die Methode für die Liquordiagnose brauchbar zu machen und evtl. sie zu einer quantitativen zu gestalten.

Zusammenfassung.

1. Die in verdünnten Harnen nach Zusatz von *P. Ehrlichs* Aldehyd auftretende Gelbgrünfärbung ist durch Harnstoff bedingt. Außer Allantoin zeigt kein anderer Harnbestandteil die Reaktion. Zu dem Zustandekommen der Reaktion ist die Gegenwart freier H'-Ionen nötig, das Säureanion scheint ohne Einfluß zu sein.

2. In mit Trichloressigsäure enteiweißtem Serum tritt die Reaktion bei einem Reststickstoffgehalt, der 36—40 mg-$^0/_0$ überschreitet, auf und kann als einfacher qualitativer Nachweis von vermehrtem Rest-N Verwendung finden.

---

[1]) *Bang*, Einige Methoden usw. Wiesbaden, Bergmann.

[2]) *Gettler* und *Baker*, Journ. of biol. chem. **25**.

[3]) *Folin* und *Denis*, ebenda **11**, **12** und **38**.

[4]) *F. S. Hammett*, ebenda **41**.

Nachtrag bei der Korrektur.

In weiterer Verfolgung der praktischen Auswertung der Reaktion für die Schätzung des Rest-N im Serum hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Menge des Aldehydreagens, die wir zu 1ccm Serumfiltrat zusetzen, auf 4—5 Tropfen, ca. 0,25 ccm, zu erhöhen. Ein darüber hinausgehender Zusatz des Reagens kann durch die Eigenfarbe der Aldehydlösung zu Täuschungen führen. Unsere Ergebnisse haben wir fortlaufend an dem Material des medizinisch-chemischen Institutes nachgeprüft. In nunmehr rund 100 Fällen — darunter neu hinzugekommen 5 Fälle von Nephritis mit hochgradiger Azothämie, ein Fall von Sublimatvergiftung, 2 Fälle von Eklampsie — konnten sie ausnahmslos bestätigt werden. Aus Gründen der Raumersparnis sehen wir von einer tabellarischen Veröffentlichung dieser Resultate ab. Auf eine mögliche, allerdings seltene Fehlerquelle möchten wir kurz hinweisen. Unter den zahlreichen, von uns untersuchten Seren kamen uns bisher zwei unter — in beiden Fällen handelte es sich um schwere Stauungszustände mit Zyanose und Stauungsleber —, bei denen nach Zusatz des Aldehydreagens eine eigentümliche Gelbrotfärbung auftrat, die im Verlauf einiger Stunden in ein ausgesprochenes Eosinrot mit starker grüner Fluoreszens überging. Die Lösung zeigte spektroskopisch eine diffuse Verdunklung vom Grün angefangen, ohne erkennbare Absorptionsstreifen. Bei längerem Stehen fiel der Farbstoff in amorphen Flocken aus. Mangel an Material verhinderte uns bisher, dieser Farbstoffbildung, über deren chemische Natur wir vorläufig keine Vermutung äußern wollen, weiter nachzugehen.

Zur Aufklärung der ,,grünen Benzaldehydreaktion" in ikterischen Harnen, die *Meyer-Estorf* (l. c.) beschreibt, möchten wir bemerken, daß es sich nach unseren Untersuchungen um nitrithaltige Harne handelt. Durch die Salzsäure des Aldehydreagens kommt es zur Bildung freier HNO_2, welche die Oxydation des Bilirubins zu Biliverdin bewirkt.

Die Chlorverteilung zwischen Blutkörperchen und Plasma und der Einfluß der Kohlensäurespannung auf dieselbe.

Von

Z. Dische.

(Aus der III. Medizinischen Abteilung und dem Chemischen Laboratorium des Kaiserin Elisabeth-Spitales in Wien.)

(Eingegangen am 8. Mai 1922.)

Seitdem *W. Falta* und *M. Richter-Quittner* über eine größere Reihe von Versuchen berichtet haben, in denen sie zeigen konnten, daß beim Menschen und bei allen von ihnen untersuchten Tierarten die Blutkörperchen unter normalen Verhältnissen keine oder nur geringe Mengen von Chlor enthalten, haben sich eine Anzahl Autoren mit dieser Frage beschäftigt.

Sowohl *E. K. Warburg* als auch *Wiechmann* haben sich gegen die Annahme von *Falta* und *Richter-Quittner* ausgesprochen und auch *Siebeck* hatte andere Resultate erhalten. *A. Muresanu* ist in seiner, aus dem hiesigen Laboratorium stammenden Arbeit, ausführlich auf diese Untersuchungen eingegangen und hat neues Material zur Stütze der eingangs erwähnten These beigebracht. Gleichzeitig mit der Arbeit von *A. Muresanu* ist eine Arbeit von *S. van Creveld* erschienen, welcher gegen die Untersuchungen von *Falta* und *Richter-Quittner* Stellung nahm. Dies gab die Veranlassung zu den folgenden Untersuchungen. *van Creveld* geht von den Versuchen von *Hamburger, Fridericia* usw. aus, nach denen die Chlorverteilung zwischen Körperchen und Plasma hauptsächlich von der Kohlensäurespannung des Plasmas abhängig sein soll. *van Creveld* glaubt daher, daß bei den Untersuchungen von *W. Falta* und *M. Richter-Quittner* eine Fehlerquelle darin besteht, daß das Entweichen der Kohlensäure aus dem Plasma bei der Gewinnung des Blutes nicht verhindert wurde; dadurch müßte eine Wanderung von Chlorionen aus den Körperchen in das Plasma eintreten; wenn daher die Körperchen chlorfrei gefunden würden, so sei dies noch kein Beweis, daß sie im strömenden Blut auch wirklich chlorfrei gewesen seien. Auf Grund dieser Überlegung untersucht *van Creveld* arterielles wie venöses Kaninchenblut, welches mittels einer paraffinierten Kanüle in kurz vor dem Versuch paraffinierten Röhrchen unter Paraffinöl aufgefangen und nach sorgfältigem Verschluß in den Röhrchen sofort zentrifugiert worden war. In diesen Versuchen findet nun *van Creveld* immer beträchtliche Mengen von Chlor in den Körperchen, sowohl des arteriellen, wie des venösen Blutes, und zwar in letzterem etwas weniger als in ersterem.

In einer zweiten Tabelle teilt *van Creveld* Versuche mit, bei denen das rasch aus der Ohrvene tropfende Blut in offenen paraffinierten Röhrchen aufgefangen wurde. Hier wurde also der Kontakt mit der Luft nicht verhindert. In diesen

Versuchen (im ganzen 10) findet *van Creveld* sehr verschiedene Werte in den Blutkörperchen. 3 mal waren die Körperchen ganz chlorfrei, in den übrigen 7 Versuchen schwankten die Werte (von mir berechnet) zwischen 190 und 350 mg-%. Endlich wird noch eine dritte Reihe von im ganzen 6 Versuchen mitgeteilt, bei denen der Kontakt mit der Luft während des Zentrifugierens durch Verschließen der vollen Röhrchen verhindert worden war; hier wurden ähnliche Verhältnisse gefunden wie in der Reihe 2, woraus geschlossen wird, daß die Chlorwanderung hauptsächlich während des Auffangens des Blutes zustande kommt.

Schon eine genaue Betrachtung der von *van Creveld* mitgeteilten Zahlen läßt gegen seine Schlüsse schwerste Bedenken aufkommen. Wenn die Annahme von *van Creveld* richtig ist, so ist natürlich anzunehmen, daß die Chlorverschiebung, die sich zwischen Plasma und Körperchen unter dem Einfluß der aus dem Plasma entweichenden Kohlensäure abspielt, den Chlorgehalt des Gesamtblutes unbeeinflußt läßt. In Reihe I, wo das Entweichen der Kohlensäure verhindert wurde, finden sich nun durchwegs sehr hohe Chlorwerte im Gesamtblut. Wäre hier das Entweichen der Kohlensäure nicht verhindert worden und wäre hier das Chlor, wie *van Creveld* für *unsere* Versuche annimmt, quantitativ in das Plasma hinübergewandert, so würden sich viel zu hohe Chlorwerte im Plasma finden, durchschnittlich 0,731% NaCl. Auffallend ist ferner, daß bei *van Creveld* in Reihe II und III die Chlorwerte des Gesamtblutes außerordentlich differieren. Wir finden da in Reihe II Werte zwischen 398 und 507 mg-%. Noch auffallender ist aber, daß gerade jene Versuche, in denen die Körperchen chlorfrei errechnet werden, die tiefsten Chlorwerte im Gesamtblut aufweisen. Nun besteht ja der Gegensatz zwischen den Befunden des hiesigen Laboratoriums und denen der anderen Autoren nicht etwa in den Plasma- bzw. Serumwerten; in dieser Beziehung stimmen die Werte, wie gesagt, ziemlich überein, sondern in den im hiesigen Laboratorium gefundenen tiefen Chlorwerten des Gesamtblutes, und es taucht daher der Verdacht auf, daß die hohen Chlorwerte anderer Autoren ihre Erklärung darin finden könnten, daß die organische Substanz nicht vollkommen zerstört wurde, worauf bei der Besprechung der Methodik noch eingegangen werden soll. Gegen die Deduktion *van Crevelds* läßt sich ferner folgender Einwand erheben. *Fridericia* hat in sehr schönen Versuchen gezeigt, daß beim Schütteln von Blut mit einem Luftgemisch von wechselnder Kohlensäurespannung verschiedene Mengen von Chlorionen in die Blutkörperchen eindringen und zwar um so mehr, je mehr Kohlensäure in dem Gemisch vorhanden war. Dies läßt sich unserer Ansicht nach durch eine entsprechend größere oder geringere Quellung der Blutkörperchen erklären. Nun hat schon *Muresanu* darauf hingewiesen, daß man diese Beobachtungen in vitro nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse im strömenden Blut übertragen darf, denn das Schütteln mit einem kohlensäurehaltigen Luftgemisch in vitro ist wohl etwas anderes, als wenn

dem Blut beim Durchströmen durch die Capillaren Sauerstoff entzogen und Kohlensäure beigemischt wird. Das zeigt sich schon an der Quellung der Blutkörperchen, die beim Schütteln regelmäßig auftritt, während, wie *Aiello* in dem hiesigen Laboratorium gezeigt hat, die Blutkörperchen des venösen Blutes meist einen leichten Grad von Entquellung zeigen. Endlich ist es vom physikalisch-chemischen Standpunkt fast unverständlich, daß relativ so große Chlormengen, wie sie nach *van Creveld* in den Blutkörperchen des strömenden Blutes angenommen werden müßten, in einzelnen Fällen sogar quantitativ aus den Körperchen entweichen sollten.

Methodik.

Das Blut wurde früh nüchtern durch Aderlaß gewonnen, durch Defibrinieren oder Zugabe von 1—2 g Natriumcitrat auf 100 ccm Blut ungerinnbar gemacht. Das Eiweiß wurde nach dem Veraschungsverfahren von *Koranyi* zerstört, die Titration erfolgte nach *Volhard*. Die Technik gestaltete sich folgendermaßen: 1 ccm Blut, Plasma oder Serum wurde mit 30 ccm Wasser verdünnt, 15 ccm konzentrierter chemisch reiner, chlorfreier Salpetersäure Kahlbaum (spez. Gew. 1,40) hinzugegeben und mit 5 ccm $^{n}/_{10}$-Silbernitratlösung versetzt. Man erhitzt unter Zugabe von etwas Kaliumpermanganat in Substanz so lange, bis alles Eiweiß zerstört ist, was beim Gesamtblut mehrere Stunden Zeit erfordert. Kochen ist absolut zu vermeiden, da sich bei zu starkem Erhitzen trotz der Silberfällung flüchtiges HCl bilden kann. Das so erhaltene Reaktionsgemisch muß absolut eiweißfrei sein, da selbst kleine Mengen organischer Substanz nicht unbeträchtliche Mengen Silbernitrat binden, wodurch man zu hohe Werte erhalten würde. Es erweist sich als zweckmäßig, die Veraschung am Rückflußkühler nach dem Vorschlag von Prof. *Falta* vorzunehmen. Dies hat den Vorteil, daß man nun kochen kann, ohne Chlorverluste befürchten zu müssen, was eine bedeutende Zeitersparnis bedingt. Selbstredend muß man Kolben und Kühler mit Glasschliff verwenden, da Gummistöpsel beim Erhitzen mit Salpetersäure Rhodanverbindungen abspalten. Nach dem vollständigen Erkalten wird alles überschüssige Kaliumpermanganat mit Ferrosulfat zerstört und die Titration des überschüssigen Silbernitrates nach *Volhard* vorgenommen.

Die Bestimmung des Chlors nach *Koranyi* läßt 2 Fehlerquellen zu. 1. Können, wie gesagt, Chlorverluste durch zu starkes Erhitzen vorkommen und 2. kann man zu hohe Werte dadurch erhalten, daß die Zerstörung des organischen Materials nicht vollständig durchgeführt wurde.

Meine eigenen Versuche, die ich nun mitteile, konnten, wie erwartet, keine Bestätigung der *van Creveld*schen Befunde bringen.

Tabelle I. Chlorbestimmungen im ohne Paraffinabschluß aufgefangenen Blute von normalem Individuum.

Datum 1922	Name	Diagnose	Blutkörperchenvolumen	Chlor im Gesamtblut	Chlor im Plasma	Chlor im Serum	Chlor in den Blutkörperchen
27. II.	Wo.	normal	44,0	0,219	—	0,360	+0,039
22. II.	Sm.	"	45,0	0,186	—	0,340	−0,002
9. II.	Schi.	Rek. n. Grippe	44,0	0,182	0,336	—	−0,013
16. I.	Ra.	normal	44,0	0,188	—	0,333	−0,004
7. I.	Sve.	"	43,0	0,207	—	0,380	−0,019
9. XI.	Ma.	"	45,0	0,182	—	0,340	−0,011
5. XI.	La.	Nervenfall	47,6	0,188	—	0,358	+0,004
14. I.	Stei.	normal	40,0	0,202	0,336	—	+0,001

Tabelle II. Chlorbestimmungen im ohne Paraffinabschluß aufgefangenen Blute von pathologischen Fällen. Das Serum wurde nach Defibrinierung durch Zentrifugieren gewonnen.

Datum 1922	Name	Diagnose	Blutkörperchenvolumen	Chlor im Gesamtblut	Chlor im Serum	Chlor in den Blutkörperchen
19. I.	Gro.	Empyem	46,0	0,270	0,379	+0,141
9. I.	Wer.	Nephrose	35,0	0,285	0,355	+0,154
3. III.	Kö.	Hypertonie	46,0	0,300	0,363	+0,236

Tabelle III. Chlor-Bestimmungen im unter Paraffinabschluß aufgefangenen Blute von normalen und pathologischen Fällen. Das Plasma wurde durch Zentrifugieren der paraffinierten und entsprechend verschlossenen Röhrchen gewonnen.

Datum 1922	Name	Diagnose	Blutkörperchenvolumen	Chlor im Gesamtblut	Chlor im Plasma	Chlor in den Blutkörperchen
22. II.	Smn.	normal	45,0	0,182	ohne Paraffinabschluß 0,336	+0,007
					unter Paraffinabschluß 0,317	+0,017
3. III.	Kö.	Hypertonie	46,0	0,300	ohne Paraffinabschluß 0,363	+0,236
					unter Paraffinabschluß 0,350	+0,241

Auf Grund der hier mitgeteilten Versuche kommen wir zu dem Schluß, *daß bei normalen Individuen sowohl im strömenden Blute wie in dem aus den Blutgefäßen unter Entweichen von Kohlensäure getretenen Blute die Blutkörperchen chlorfrei sind.* Bei gewissen Erkrankungen, besonders Nierenfällen und Hypertonien, enthalten hingegen die Blutkörperchen des sowohl ohne als unter Paraffinabschluß aufgefangenen

Tabelle IV. Chlorbestimmungen im unter Paraffinabschluß aufgefangenen Blute von normalen und pathologischen Fällen. Das Plasma wurde unter Zusatz von Natriumcitrat durch Zentrifugieren gewonnen.

Datum 1922	Name	Diagnose	Blutkörperchenvolumen	Chlor im Gesamtblut	Chlor im Plasma	Chlor in den Blutkörperchen
27. II.	Wo.	normal	44,0	0,219	ohne Paraffinabschluß 0,360	+0,034
					unter Paraffinabschluß 0,371	+0,029
16. I.	Ra.	"	44,0	0,188	ohne Paraffinabschluß 0,333	+0,004
					unter Paraffinabschluß 0,334	+0,004
19. I.	Gro.	Empyem	46,0	0,270	ohne Paraffinabschluß 0,379	+0,141
					unter Paraffinabschluß 0,370	+0,152

Blutes Chlor in beträchtlicher Menge, ein Umstand, der, soweit unsere bisherigen Erfahrungen reichen, mit einer Quellung der Blutkörperchen einhergeht; der Chlorgehalt des Serums ist aber auch in diesen Fällen von ungefähr derselben Größe. Wir können daher *van Creveld* auch in den Konsequenzen, die er auf Grund seiner Untersuchungen für die Klinik gezogen hat und die die gesamten Chlorbestimmungen der Literatur als vom biologischen Standpunkt anfechtbar erscheinen lassen, nicht folgen; denn es ist vor allem wichtig, den Chlorgehalt des Plasmas bzw. Serums zu kennen, da nur dieser Wert für den Schwellenwert der Niere maßgebend ist. Das Auftreten von Chlor in den Körperchen hat darauf keinen Einfluß und dürfte ein Zeichen pathologischer Quellungsvorgänge sein.

Literatur.

[1]) *Aiello, J.*, diese Zeitschr. **124**, 100. 1921. — [2]) *Austin, H.* und *D. van Slyke*, Journ. of biol. chem. **41**, 345. 1920. — [3]) *Bönninger, M.*, diese Zeitschr. **122**, 258. 1921. — [4]) *Creveld, S. van*, diese Zeitschr. **123**, 304. 1921. — [5]) *Falta, W.* und *M. Richter-Quittner*, diese Zeitschr. **100**, 148. 1919. — [6]) *Falta, W.* und *M. Richter-Quittner*, diese Zeitschr. **114**, 145. 1921. — [7]) *Fridericia, S.*, Journ. of biol. chem. **42**, 245. 1920. — [8]) *Koranyi, A. von*, Zeitschr. f. klin. Med. **33**, 1. 1897. — [9]) *Muresanu*, diese Zeitschr. **124**, 114. 1921. — [10]) *Rusznyak*, diese Zeitschr. **110**, 60. 1920. — [11]) *Rusznyak, S.*, diese Zeitschr. **114**, 23. 1920. — [12]) *Siebeck*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **85**, 214. 1920. — [13]) *Wiechmann*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **189**, 109. 1921. — [14]) *Wiechmann*, Dtsch. med. Wochenschr. **1921**, S. 824.

Über Zuckerschwefelsäuren.

IV. Mitteilung.

Von

Heinz Ohle.

(Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Chemische Abteilung, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 17. Mai 1922.)

Des öfteren haben *Neuberg* und Mitarbeiter darauf hingewiesen, daß die *Schwefelsäure-ester der Zuckerarten* in chemischer wie biologischer Hinsicht Beachtung verdienen[1]). Das Interesse an diesen Substanzen stieg, als vor Jahresfrist eine so häufig benutzte Substanz wie der Agar von *Neuberg* und *Ohle*[2]) sowie *Samec*[3]) als Kohlenhydrat-schwefelsäure erkannt wurde. Die künstliche Darstellung solcher Verbindungen ist daher wünschenswert geworden.

Verschiedene einfache Verfahren zur Gewinnung von Mono-schwefelsäuren der Zucker haben *Neuberg* und *Pollak* sowie *Neuberg* und *Liebermann* angegeben[1]); mit Hilfe derselben gelang es, Salze von Glucose- und Saccharose-mono-schwefelsäuren zu fassen, deren Konstitutionsermittelung jedoch noch aussteht. Auf Anregung von Herrn Prof. *Neuberg* habe ich diese Aufgabe in Angriff genommen.

Als Versuchsobjekt wählte ich den einfachsten Zucker: die *Glucose*. Es zeigte sich später, daß gerade dieser von allen anderen untersuchten die günstigsten experimentellen Bedingungen bot. Ich folgte zunächst der Vorschrift von *Neuberg* und *Liebermann* und acetylierte dann das nach dem Abdestillieren des Pyridins im Vakuum erhaltene Gemisch der Pyridinsalze direkt mit Acetanhydrid und Natriumacetat. So konnte leicht ein gut krystallisierendes *Natrium-* und *Pyridin-salz der vollständig acetylierten Glucose-mono-schwefelsäure* bereitet werden. Durch Verseifung mit Barytwasser bei Zimmertemperatur gelangt man vom letzteren zum Brucinsalz einer Glucose-mono-schwefelsäure; dieses ist identisch mit einem von *T. Soda*[4]) hergestellten Material, das nach einem verbesserten Verfahren über das Bariumsalz der Glucose-mono-schwefelsäure unmittelbar erhalten wird.

---

[1]) *C. Neuberg* und *H. Pollak*, diese Zeitschr. **26**, 514, 1910; Ber. **43**, 2060, 1910. — *C. Neuberg* und *L. Liebermann*, diese Zeitschr. **121**, 326, 1921.

[2]) *C. Neuberg* und *H. Ohle*, diese Zeitschr. **125**, 311, 1921.

[3]) *M. Samec* und *V. Ssajewič*, Chem. Centralblatt **22**, I. 1113.

[4]) Die Arbeit wird demnächst in dieser Zeitschr. erscheinen.

Die Tatsache, daß auf beiden Wegen die gleiche Glucose-mono-schwefelsäure als Hauptprodukt entsteht, läßt darauf schließen, daß der Schwefelsäurerest in der Tetra-acetyl-glucose-mono-schwefelsäure an derselben Stelle haftet wie in der Muttersubstanz. Denn es ist kaum anzunehmen, daß eine während der Acetylierung eventuell stattfindende Umesterung[1]) bei der Verseifung in einem *anderen Medium* wieder rückgängig gemacht wird. Die bei den Acetonverbindungen gewisser Acylderivate der Glucose gesammelten Erfahrungen erlegen zwar eine besondere Vorsicht in derartigen Schlußfolgerungen auf. In diesem Falle tritt nämlich in der Tat der in Erwägung gezogene Vorgang ein, wie am Beispiel der Benzoyl-glucose in der folgenden Arbeit gezeigt werden wird. Man muß aber berücksichtigen, daß in diesem Falle die Umlagerungen von dem *gleichen* Katalysator Salzsäure, bewirkt werden.

Zum Vergleiche mit dieser acetylierten Säure habe ich die nach *Fischers* Vorschrift[2]) leicht zugängliche Tetra-acetyl-glucose sulfoniert und so eine zweite Tetra-acetyl-glucose-schwefelsäure in Form ihres Natrium- und Pyridinsalzes dargestellt. Sie ist von der vorhergehenden völlig verschieden; sie spaltet auch viel leichter den Schwefelsäurerest ab. Ihrer Herkunft nach müßte sie die SO_3H-Gruppe in Stellung 1 enthalten. Da aber bei dem Austausch des Broms der Acetobromglucose gegen die Hydroxylgruppe bei Herstellung der β-Tetra-acetylglucose einerseits, bei der Sulfonierung mit Chlorsulfonsäure andererseits ein Platzwechsel der Acetyle nicht völlig ausgeschlossen ist, so habe ich versucht, auf einem anderen Wege zu der gleichen Säure zu gelangen. Bei der Einwirkung von Silbersulfat auf Acetobromglucose war es indessen nicht möglich, die Reaktion so zu leiten, daß die beiden Komponenten im Molverhältnis 1 : 1 reagieren. Selbst bei einem großen Überschuß an Silbersulfat bildet sich immer eine Verbindung, die keine Salzeigenschaften besitzt. Diese Substanz, deren Natur bis jetzt noch nicht aufgeklärt ist, zeigt den Schmelzpunkt 143—144° und $[\alpha]_D^{15,5} = -12{,}87°$ (in Chloroform). Wie aus der optischen Aktivität und aus den Ausbeuten hervorgeht, müssen noch 2 Glucosekomplexe in ihr vorhanden sein. Sie enthält weder Brom noch Silber, noch Pyridin. Ihr Schwefel ist organisch gebunden und wird in sauren und alkalischen Medien sehr leicht als Schwefelsäure in Freiheit gesetzt, aber die Analysen stehen nicht im Einklang mit der Formel eines Octacetyl-di-glucose-schwefelsäure-esters.

Die gleiche Substanz vom Schmelzpunkte 143—144° entsteht nun, wenn man das Pyridinsalz der zweiten Tetra-acetyl-glucose-mono-schwefelsäure mit Acetobromglucose in Gegenwart von Silbercarbonat

[1]) *M. Bergmann*, Festschr. der Kaiser Wilhelm-Gesellschaft, redig. von C. Neuberg, Berlin *1921* bei J. Springer.

[2]) Ber. **45**, 914. 1912.

reagieren läßt. Im Zusammenhang mit der großen Beweglichkeit des Schwefelsäurerestes in diesen Verbindungen dürfte bereits das vorliegende Material zu dem Schluß hinreichen, daß bei der Darstellung der Säure aus Tetracetyl-glucose keine Umlagerung eingetreten ist und daß sie demnach als Tetracetyl-glucose-1-schwefelsäure zu betrachten ist. Zum Unterschied von dieser Säure mag die durch direkte Sulfonierung der Glucose erhaltene Verbindung als Tetracetyl-glucose-6-schwefelsäure bezeichnet werden, da die Stellung 6 nächst Stellung 1 die größte Wahrscheinlichkeit für den Eintritt der Schwefelsäuregruppe besitzt. Der exakte Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme wird später geliefert werden.

Nach dem eingangs erwähnten Verfahren konnten auch das *Natriumsalz der Tri-acetyl-β-methyl-glucosid-mono-schwefelsäure* und das *Brucinsalz ihrer Muttersubstanz* gewonnen werden, nicht dagegen die entsprechenden Verbindungen der α-Reihe; nicht befriedigend sind bisher diesbezügliche Versuche bei der Galaktose, Fructose und Saccharose verlaufen.

Experimenteller Teil.

Tetracetyl-glucose-6-schwefelsäure.

Zu allen im folgenden beschriebenen Sulfonierungen diente dieselbe Apparatur. Die Reaktion wurde in einem weiten, starkwandigen Reagensglase, das etwa 150 ccm faßt, ausgeführt. Dieses wird mit einem gut passenden Korkstopfen verschlossen, der 4 Durchbohrungen hat: 1. Für den mit Quecksilber abgedichteten Rührer, 2. für den Tropftrichter, 3. für das Thermometer und 4. für ein Chlorcalciumrohr.

11 g fein gepulverter Glucose werden in 50 ccm Pyridin suspendiert; das Gemisch wird in dem Reagensglase durch eine Kältemischung gekühlt. Sobald die Innentemperatur unter —10° gesunken ist, läßt man aus dem Tropftrichter ein Gemisch von 3,4 ccm Chlorsulfonsäure und 10 ccm alkoholfreiem Chloroform langsam hinzutropfen. Nachdem alle Chlorsulfonsäure zugegeben worden ist, entfernt man die Kühlung und läßt nach längerer Rührdauer das Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Sodann wird das Rührwerk durch einen vorher verpaßten Destillationsaufsatz ersetzt und Chloroform nebst Pyridin im Vakuum bei ca. 50° abdestilliert. Zu dem gelblichen sirupösen Rückstand fügt man eine siedende Lösung von 10 g Natriumacetat in 30 ccm Acetanhydrid und 20 ccm Eisessig, und sorgt durch Umrühren mit einem starken Glasstabe für gute Durchmischung. Dabei löst sich der gelbe Sirup zunächst auf, unmittelbar darauf aber scheidet sich ein Gemisch von Natriumsalzen der anorganischen Säuren ab. Zur Vervollständigung der Acetylierung hält man das Reaktionsgut noch ca. 2 Stunden bei 60—70° und saugt die noch warme Flüssigkeit durch ein mit Tierkohle bestreutes Filter aus Asbestpapier ab. Die Abtrennung von den anorganischen Salzen ist jedoch nicht vollkommen,

da ganz feine Partikelchen das Filter leicht passieren. Man läßt daher das schwachgetrübte, braune Filtrat über Nacht im Eisschrank stehen, wobei die Suspension sich absetzt und gleichzeitig der größte Teil des noch vorhandenen Natriumacetats ausfällt. Die davon befreite Lösung wird nunmehr in einem geräumigen Scheidetrichter mit viel Äther versetzt, wobei sich sämtliche Salze abscheiden, während entstandene Pentacetyl-glucose in Lösung bleibt. Man nimmt den flockigen, zum Teil verschmierenden Niederschlag mit ca. 50 ccm Wasser auf, schüttelt durch und wiederholt diese Ausschüttelung 3 mal mit frischem Äther. Die wässerige Lösung reagiert dann nur noch ganz schwach sauer und kann ohne Zersetzung des tetra-acetyl-glucose-schwefelsauren Natriums im Vakuum bei 40° zur Trockne gebracht werden. Es hinterbleibt eine schwach bräunlich gefärbte, amorphe, blasige Masse, die man in ca. 100 ccm siedendem, absoluten Alkohol löst. Geringe Mengen anorganischer Salze bleiben dabei zurück und werden abfiltriert. Beim freiwilligen Verdunsten des Alkohols setzt sich nach Zugabe einiger Tropfen Wasser das Natriumsalz der Tetracetyl-glucose-6-schwefelsäure in ganz feinen Krystallblättchen ab. Die Ausbeute an Rohprodukt beträgt 5 g. Beim Umkrystallisieren aus absolutem Alkohol scheidet sich das Salz nicht krystallisiert, sondern als Gel ab. Der Zusatz von 1% Wasser genügt aber bereits, um es in schönen Krystallen zu erhalten, die schon analysenrein sind und bei 137° unter Zersetzung schmelzen.

Wie nach dem soeben beschriebenen Verhalten zu erwarten war, enthalten sie Krystallwasser, und zwar $^1/_2$ Mol, das sie nur unter Zersetzung verlieren. Das Drehungsvermögen dieses Präparates hatte den Wert $[\alpha]_D^{19} = \frac{+0{,}88 \cdot 100}{3{,}535 \cdot 2} = +12{,}45°$ (Wasser; 2-dcm-Rohr). Bei nochmaligem Umkrystallisieren veränderte sich die Drehung nur unwesentlich. Sie betrug $[\alpha]_D^{19} = \frac{+0{,}72 \cdot 100}{2{,}828 \cdot 2} = +12{,}73°$ (Wasser; 2-dcm-Rohr).

Ein zweites Präparat zeigte die Drehung $[\alpha]_D^{17,5} = \frac{+0{,}86 \cdot 100}{3{,}438 \cdot 2} = +12{,}50°$ (Wasser; 2-dcm-Rohr).

Zur Analyse wurden die Präparate bei ca. 80° im Vakuum über P_2O_5 getrocknet.

0,1651 g Substanz: 0,2203 g CO_2, 0,0688 g H_2O.
0,1505 g Substanz: 0,2023 g CO_2; 0,0634 g H_2O.
0,2800 g Substanz: 0,1467 g $BaSO_4$.
0,2699 g Substanz: 0,0430 g Na_2SO_4.

	C	H	S	Na
Gefunden I	36,39%	4,66%	7,18%	5,16%
„ II	36,66%	4,71%	—	—
Berechnet für $C_6H_7O_6(C_2H_3O)_4SO_3Na$ (= 450)	37,33%	4,22%	7,11%	5,11%.
Berechnet für dasselbe Salz + $^1/_2$ H_2O (=459)	36,60%	4,36%	6,97%	5,01%.

Verschiedene Versuche zur Verbesserung der Ausbeute verliefen ergebnislos. Längeres Erhitzen während der Acetylierung steigerte den Ertrag nicht; die Anwendung höherer Temperatur verschlechtert ihn. Bricht man die Acetylierung schon nach einer Viertelstunde ab, so ist sie vollständig; man erhält 2- und 3fach acetylierte Verbindungen, deren Natriumsalze in Äthylalkohol leicht löslich sind und durch Amylalkohol in amorphem Zustand ausgefällt werden können. (Da Anhaltspunkte für die Reinheit dieser Körper schwer zu gewinnen sind, sollen sie außer Betracht bleiben.)

Aus diesen Versuchen geht jedenfalls hervor, daß der Schwefelsäurerest mit einer relativ großen Festigkeit am Zuckerkomplex haftet, wodurch die im theoretischen Teil gemachte Annahme bezüglich der Konstitution dieser Verbindung eine starke Stütze erhält. Die mäßige Ausbeute ist wohl in erster Linie auf die ungünstigen Versuchsbedingungen zurückzuführen; sowohl die Glucose als auch das Pyridinsalz der Glucose-mono-schwefelsäure sind in Pyridin nur mäßig löslich. Da sich das letztere in sirupöser Form ausscheidet, so schließt es noch unangegriffene Glucosepartikelchen ein und schützt sie so vor einem weiteren Angriff durch die Chlorsulfonsäure. Zweifellos entstehen auch bei der Acetylierung Verluste, die aber wohl weniger ins Gewicht fallen; denn bei einer Ausdehnung der Versuchsdauer um das Doppelte nimmt die Ausbeute nicht merklich ab. Für das Gelingen der Acetylierung scheint die Gegenwart von Pyridin erforderlich zu sein; die mit dem Bariumsalz der Glucose-schwefelsäure unternommenen Acetylierungsversuche ergeben nämlich ungünstige Resultate.

Das Pyridinsalz der Säure läßt sich aus der Natriumverbindung ohne Schwierigkeit durch Umsetzung mit Pyridinchlorhydrat in alkoholischer Lösung und in Gegenwart eines Pyridinüberschusses gewinnen. Da das Pyridinsalz in Alkohol beträchtlich löslicher ist als das Natriumsalz, wendet man mit Vorteil eine wesentlich geringere Alkoholmenge an als zur vollständigen Auflösung des Natriumsalzes erforderlich ist. Aus 10 g des Natriumsalzes wurden auf diese Weise 8,3 g Pyridinsalz erhalten. Dieses Rohprodukt zeigt die Drehung $[\alpha]_D^{20} = +12{,}61°$. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus der 5fachen Menge Alkohol erhält man ein reines Produkt vom Schmelzpunkt 158—160° und $[\alpha]_D^{18} = \frac{+0{,}8 \cdot 100}{3{,}417 \cdot 2} = +11{,}71°$ (Wasser; 2-dcm-Rohr). Für ein zweites Präparat wurde der Wert $[\alpha]_D^{17} = +11{,}64°$ gefunden.

Zur Analyse wurde die Substanz bei Zimmertemperatur im Vakuum über Chlorcalcium getrocknet.

0,1390 g Substanz: 3,3 ccm N (20°, 757 mm).

0,2103 g Substanz: 0,0963 g $BaSO_4$.

	N	S
Gefunden	2,72%	6,29%
Berechnet für $C_6H_7O_6(C_2H_3O)_4SO_3H \cdot C_5H_5N$ (= 507)	2,76%	6,31%

Zur Verseifung des Pyridinsalzes der Tetra-acetyl-glucose-6-schwefelsäure läßt man seine Lösung in Barytwasser 24—36 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, versetzt dann mit so viel verdünnter Schwefelsäure, daß das Barium quantitativ entfernt wird und löst in dem Filtrat vom Bariumsulfat-niederschlage die berechnete Menge von Brucin auf. Die nach dem Eindampfen im Vakuum bei ca. 40° zurückgebliebene amorphe Masse wird zunächst gründlich mit Äthylalkohol ausgekocht, wobei das Brucinsalz der Glucose-6-schwefelsäure ungelöst bleibt. Der Rückstand wird in wenig Wasser aufgenommen und auf einem Uhrglase im Vakuumexsiccator eingeengt. Die Lösung gesteht zu einem Krystallbrei, bestehend aus dichten Büscheln schmaler Blättchen, die mit verdünntem Alkohol auf ein Saugfilter gebracht, mit derselben Flüssigkeit gewaschen und auf Ton gestrichen werden. Die Substanz verflüssigt sich bei 183° unter Zersetzung. Durch Umkrystallisieren aus Wasser und Aceton steigt der Schmelzpunkt auf 184°. Die spezifische Drehung beträgt anfangs $[\alpha]_D^{17} = -4{,}07°$, nach 12 Stunden $-6{,}28°$. Nähere Angaben über das Brucinsalz werden in der demnächst erscheinenden Arbeit von T. Soda zu finden sein. Während der Verseifung mit Barytwasser findet eine nicht unbeträchtliche Schwefelsäureabspaltung statt.

Tetra-acetyl-glucose-1-schwefelsäure.

8 g Tetracetyl-glucose werden in 50 ccm Pyridin gelöst und mit einem Gemisch von 1,4 ccm Chlorsulfonsäure und 10 ccm Chloroform behandelt. Der nach dem Abdestillieren des Pyridins und Chloroforms zurückbleibende Sirup wird in 25 ccm Alkohol gelöst und in ein Becherglas übergeführt. Die Krystallisation des Pyridinsalzes setzt alsbald ein und wird durch mehrstündiges Aufbewahren im Eisschrank vervollständigt. Die Ausbeute beträgt 4 g. Sie konnte in einem zweiten Versuch noch etwas gesteigert werden. Das Rohprodukt ist bereits fast rein, es schmilzt bei 127° unter Zersetzung und hat $[\alpha]_D^{17,5} = \frac{-0{,}37 \cdot 100}{3{,}885 \cdot 2} = -4{,}65°$ (Wasser; 2-dcm-Rohr). Nach einmaligem Umlösen aus Alkohol in Gegenwart von etwas Pyridin sind Schmelzpunkt und Drehungsvermögen praktisch unverändert geblieben $[\alpha]_D^{20} = \frac{-0{,}29 \cdot 100}{3{,}005 \cdot 2} = -4{,}82°$.

Dieses Salz ist sehr empfindlich; beim kurzen Aufkochen mit Alkohol ohne Pyridinzusatz verändert es sich bereits. Beim Aufbewahren seiner wässerigen Lösung bei Zimmertemperatur findet eine beträchtliche Zersetzung statt, wobei die Drehung nach 24 Stunden auf den dritten Teil ihres Anfangswertes gesunken ist. Nach dieser Zeit ist freie Schwefelsäure in reichlicher Menge nachweisbar. Auch Trocknen bei erhöhter Temperatur verträgt das Salz nicht. Dabei verflüssigt sich die Substanz zu einer zähen Masse, die beim Erkalten hart und spröde wird, und ver-

liert gleichzeitig einen Teil der Schwefelsäure. Das Drehungsvermögen ändert dabei seinen Richtungssinn und erreicht Werte von +71 bis +85°. Sogar beim Aufbewahren in festem Zustande erleidet das Salz Veränderungen, sofern nicht jede Luftfeuchtigkeit auf das sorgfältigste ferngehalten wird.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum-exsiccator über Chlorcalcium getrocknet:

0,1631 g Substanz: 0,2688 g CO_2, 0,0770 g H_2O.
0,1347 g Substanz: 4,9 ccm N (19°, 767 mm).
0,1582 g Substanz: 0,0716 g $BaSO_4$.

	C	H	N	S
Gefunden	44,95%	5,28%	2,79%	6,22%
Berechnet für $C_6H_7O_6(C_2H_3O)_4SO_3H + C_5H_5N$ (= 507)	44,97%	4,93%	2,76%	6,31%

Das Natriumsalz wurde aus dem Pyridinsalz durch Umsetzung mit Natriumacetat in siedendem Alkohol erhalten. Es ist in diesem Lösungsmittel viel schwerer löslich als das Ausgangsmaterial und scheidet sich beim Abkühlen in langen Nadeln aus. Dieses Produkt ist sogleich analysenrein. Es schmilzt bei 149—151° unter Zersetzung und hat das Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{17} = \frac{-0,27 \cdot 100}{2,167 \cdot 2} = -6,23°$ (Wasser, 2-dcm-Rohr). Trocknet man die Substanz bei ca. 80°, so findet man augenscheinlich infolge geringer Zersetzung eine etwas schwächere Drehung, nämlich $[\alpha]_D^{18,5} = -5,81°$.

Zur Analyse wurde die bei gewöhnlicher Temperatur getrocknete Substanz genommen.

0,2127 g Substanz: 0,0327 g Na_2SO_4.
0,1896 g Substanz: 0,0956 g $BaSO_4$.

	S	Na
Gefunden	6,93%	4,87%
Berechnet für $C_6H_7O_6(C_2H_3O)_4SO_3Na$ (= 450)	7,11%	5,11%

Ob auch dieses Salz mit $^1/_2$ Mol. Wasser krystallisiert, habe ich nicht geprüft. In wässeriger Lösung zersetzt es sich leicht schon bei Zimmertemperatur unter Abspaltung von Schwefelsäure und Änderung der Drehungsrichtung. Es ist wie alle die bisher beschriebenen Salze von Glucose-schwefelsäure-derivaten hygroskopisch, doch ist diese Eigenschaft bei ihnen nicht so stark ausgeprägt wie bei den Metallsalzen ihrer nichtacylierten Muttersubstanz.

Acetobromglucose und Silbersulfat.

8,4 g Acetobromglucose (2 Mol.) werden in 50 ccm Pyridin gelöst und bei Zimmertemperatur mit 3,2 g Silbersulfat (1 Mol.) ca. 15 Stunden geschüttelt. Nach dieser Zeit ist das schwefelsaure Silber völlig verschwunden und an seiner Statt haben sich feine gelbliche Nädelchen, eine Additionsverbindung von Silberbromid und Pyridin ausgeschieden. Die Flüssigkeit hat eine schwach himbeerrote Farbe[1])

[1]) Vgl. die analogen Beobachtungen von *Mandel* und *Neuberg*, diese Zeitschr. **71**, 188. 1915.

angenommen. Beim Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum bei 60° vertiefte sich die Farbe wesentlich. Der harzige Rückstand wurde mit 100 ccm siedendem Alkohol aufgenommen, wobei sich der Rest des Silberbromids ausscheidet. Beim Erkalten krystallisieren aus der roten Lösung feine Nädelchen, die in absolut reinem Zustande weiß sind (s. unten), jedoch leicht geringe Mengen der gefärbten Mutterlauge einschließen und daher schwach rötlich erscheinen. Selbst durch wiederholtes Umlösen aus Alkohol oder anderen Solventien gelingt es nicht, die Präparate zu entfärben. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 6,8 g. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol schmilzt die Substanz bei 141—142°. Durch weiteres Umkrystallisieren kann der Schmelzpunkt nicht mehr wesentlich in die Höhe getrieben werden. Die Substanz hält beim Umlösen auch stets geringe Mengen Brom zurück, die durch längeres Kochen mit Methylalkohol und Silbercarbonat entfernt werden können. Der Schmelzpunkt steigt dann auf 143—144°. Erhöht man bei der Darstellung dieser Verbindung die Menge des Silbersulfats auf das doppelte, so erhält man kein anderes Produkt, sondern das gleiche, jedoch in viel schlechterer Ausbeute (4 g) und von niedrigerem Reinheitsgrad (Schmelzpunkt 110—120°). Es bilden sich bei diesem Modus beträchtlich größere Mengen gefärbter Substanzen.

Die störende Färbung der Präparate, die übrigens am Licht bald ausbleicht und vermutlich auf der Bildung eines vom Pyridin (oder einem Begleiter) abzuleitenden Pigments beruht, läßt sich indessen vermeiden, wenn man die Umsetzung in Aceton vornimmt und die erforderliche Menge Pyridin zufügt. Ohne Pyridin findet nämlich keine Reaktion statt. Dieser Base, die unter den letztangeführten Versuchsbedingungen sich scheinbar nicht an der Umsetzung beteiligt, fällt wohl hauptsächlich die Aufgabe zu, das Silbersulfat in Lösung zu bringen und auf diese Weise reaktionsfähig zu machen.

8,4 g Acetobromglucose werden in 100 ccm trockenem Aceton gelöst, mit 7 g fein gepulvertem Silbersulfat und 10 ccm Pyridin versetzt und 16 Stunden unter Rückfluß gekocht. Man filtriert die Silbersalze ab, verjagt das Aceton und löst den Rückstand in ca. 50 ccm Alkohol. Daraus krystallisieren ca. 3 g eines rein weißen Produktes vom Schmelzpunkt 138—140°. Es wurde mehrmals aus Alkohol umkrystallisiert. Die dabei beobachteten Schmelzpunkte und Drehungen sind folgende:

$$\left.\begin{array}{l} \text{I. } 143-44°;\ [\alpha]_D^{14,5} = \dfrac{-0{,}48 \cdot 100}{3{,}430} = -13{,}99° \\ \text{II. } 142-43°;\ [\alpha]_D^{15,5} = \dfrac{-0{,}59 \cdot 100}{4{,}590} = -12{,}85° \\ \text{III. } 142-43°;\ [\alpha]_D^{15,5} = \dfrac{-0{,}35 \cdot 100}{2{,}720} = -12{,}86° \end{array}\right\} \text{(Chloroform; 1-dcm-Rohr)}$$

Trocknet man die Substanz im Vakuum bei 100° über P_2O_5, so verliert sie nur unbedeutend an Gewicht (ca. 1,4%), doch steigt der Schmelzpunkt dadurch auf 147—149°. Die Analysenzahlen dieses Präparates und eines nach dem ersten Verfahren gewonnenen Präparates, das gleichfalls viermal aus Alkohol umgelöst worden ist, unterscheiden sich fast gar nicht. Man sollte daher annehmen, ein einheitliches Produkt in den Händen zu haben.

Die Analysenpräparate waren nur im Vakuum-exsiccator über Chlorcalcium bei Zimmertemperatur zur Gewichtskonstanz getrocknet worden. Unter a ist das nach dem ersten Verfahren dargestellte Präparat, unter b das oben unter III angeführte zu verstehen.

a) 0,1538 g Substanz: 0,2660 g CO_2; 0,0765 g H_2O.
   0,1931 g Substanz: 0,0496 g $BaSO_4$.

b) 0,1410 g Substanz: 0,2435 g CO_2; 0,0688 g H_2O.
   0,1647 g Substanz: 0,0425 g $BaSO_4$.

	C	H	S
Gefunden a)	47,17%	5,51%	3,53%
„ b)	47,10%	5,46%	3,55%
Berechnet für $[C_6H_7O_6(C_2H_3O)_4]_2SO_2$ (= 758) . . .	44,32%	5,01%	4,22%

Aus diesen Zahlen geht zweifellos hervor, daß die vorliegende Verbindung nicht der Octacetyl-diglucose-schwefelsäure-ester sein kann. Aus den gefundenen Werten würde etwa eine Formel $C_{36}H_{50}O_{25}S$ oder $C_{71}H_{100}O_{50}S_2$ herzuleiten sein, deren Auflösung allerdings zu recht unwahrscheinlichen Schlußfolgerungen führt. Die Diskussion dieser Analysenergebnisse sei solange zurückgestellt, bis weiteres experimentelles Material vorliegt.

Die neue Substanz ist leicht löslich in Aceton, Chloroform, Methylalkohol, Eisessig und siedendem Äthylalkohol, wird von kaltem Alkohol und kaltem Wasser nur in geringen Mengen aufgenommen; auch in Essigester löst sie sich nur schwach, während Petroläther, Benzol und Schwefelkohlenstoff gar keine lösende Wirkung erkennen lassen. Fügt man zu ihrer wässerigen Lösung Barytwasser hinzu, so wird schon bei gewöhnlicher Temperatur momentan fast der gesamte Schwefel als Schwefelsäure abgestoßen. In neutraler wässeriger Lösung tritt erst nach längerem Kochen freie Schwefelsäure auf. In fester Form ist sie durchaus beständig; hygroskopisch ist sie nicht.

Die Darstellung dieser Substanz aus dem Pyridinsalz der Tetracetyl-glucose-1-schwefelsäure und Acetobromglucose bedarf keiner besonderen Besprechung. Man erhält aus 1 g Pyridinsalz und 0,8 g Acetobromglucose in Gegenwart von 0,28 g Silbercarbonat und Pyridin 1,4 g. Erwähnenswert ist noch, daß bei diesem Prozeß außer dem roten Farbstoff keine anderen Nebenprodukte entstehen, obgleich Silbercarbonat auf eine Pyridinlösung von Acetobromglucose allein leicht unter Bildung eines braunen Harzes einwirkt.

Triacetyl-β-methylglucosid-schwefelsäure.

Die Darstellung des Natriumsalzes dieser Säure geschah genau nach der für die Glucose ausgearbeiteten Vorschrift, so daß zu diesem Punkt nichts weiter zu erwähnen ist. Die Ausbeute an Rohprodukt beläuft sich auf ca. 20% der Theorie. Das Salz krystallisiert aus etwa der doppelten Menge siedenden Alkohols in langen, feinen Prismen vom Schmelzpunkt 141—142° unter Zersetzung. Die Krystalle enthalten $1^1/_2$ Mol. Wasser, von denen sie beim Trocknen im Vakuum über P_2O_5 bei 100° 1 Mol. sehr leicht verlieren, während die vollständige Entwässerung erst nach 2 Tagen erreicht wird; dieses letzte halbe Wassermolekül wird auch beim Lagern der getrockneten Substanz leicht wieder aufgenommen.

0,2041 g bei gewöhnlicher Temperatur getrockneter Substanz verlieren 0,0117 g = 5,73%; berechnet für die Gewichtsabnahme um $1^1/_2$ Mol Wasser 6,01%.

3,900 mg Substanz (bei 100° getr.): 5,355 mg CO_2; 1,75 mg H_2O.

0,2302 g Substanz (bei 16° getr.): 0,1162 g $BaSO_4$.

0,0795 g Substanz (bei 16° getr.): 0,0128 g Na_2SO_4.

	C	H	S	Na
Gefunden	37,45%	5,02%	6,93%	5,21%
Berechnet für $C_7HO_6(C_2H_3O)_3SO_3Na$ (= 422)	36,97%	4,50%	—	—
Berechnet für dasselbe Salz + $1^1/_2$ H_2O (= 449)	—	—	7,13%	5,12%

Für die bei Zimmertemperatur getrocknete Substanz wurde die spezifische Drehung zu $[\alpha]_D^{18} = \frac{-0,19 \cdot 100}{3,626} = -5,24°$ bzw. $= \frac{-0,17 \cdot 100}{3,308} = -5,13°$ (Wasser; 1-dcm-Rohr) ermittelt. Das Salz ist spielend löslich in Wasser, mäßig löslich in kaltem, leicht in heißem Alkohol, wird ferner von Chloroform und Benzol, von diesem jedoch nur in der Wärme, aufgenommen, während Amylalkohol geringe Mengen löst. Die SO_3H-Gruppe haftet verhältnismäßig sehr fest und wird erst nach längerem Kochen mit verdünnter Salzsäure in merklichem Betrage abgespalten, mit verdünnten Alkalien findet bei gewöhnlicher Temperatur überhaupt keine Ablösung der Schwefelsäure statt.

Das Pyridinsalz konnte nicht in reinem Zustand gewonnen werden. Es ist in Wasser, Alkohol und sogar in Chloroform leicht löslich, in Petroläther dagegen unlöslich; es zersetzt sich schon beim Trocknen in gelinder Wärme (Temperatur des Chloroformdampfes).

Die Verseifung zur

β-Methyl-glucosid-schwefelsäure

bietet keine Schwierigkeiten und wurde in der bei der Glucose-schwefelsäure angegebenen Weise mit Barytwasser ausgeführt, nur mit dem Unterschiede, daß ich in diesem Falle nicht vom Pyridin-, sondern vom Natriumsalz des Acetylderivates ausging. Nach Beendigung der Reaktion wurde eine der Basenmenge (Ba und Na) äquivalente Portion verdünnter Schwefelsäure hinzugegeben, vom Bariumsulfat filtriert, im Filtrat ein geringer Überschuß (bezogen auf Na) von Brucin gelöst und im Vakuum zur völligen Trockenheit gebracht. Der Rückstand wurde zunächst mit wenig Alkohol ausgelaugt, dann mit einer großen Menge desselben Solvens ausgekocht. Das Brucinsalz, das in Alkohol ziemlich schwer, aber leichter löslich ist als das Brucinsalz der Glucose-schwefelsäure, geht dabei in das Lösungsmittel über. Es krystalliert aus einem Gemisch von Alkohol und Aceton mit 1 Mol. Alkohol und schmilzt unscharf zwischen 136 und 155° unter Zersetzung.

0,1713 g Substanz verloren beim Trocknen im Vakuum bei 100° über P_2O_5 0,0116 g = 6,77%; berechnet für Abgabe eines Mol. Alkohol: 6,27%.

0,1597 g Substanz: 0,0527 g $BaSO_4$ = 4,53% S. Berechnet für $C_7H_{10}O_6 \cdot SO_3H \cdot C_{23}H_{26}O_4N_2$ (= 668) 4,79% S.

Das Drehungsvermögen der Verbindung in wässeriger Lösung hatte den Wert $[\alpha]_D^{19,5} = \frac{-0,85 \cdot 100}{2,612} = -32,54°$. Die Ausbeute an reiner Substanz betrug 0,5 g aus 1 g des Natriumsalzes der acetylierten Säure.

Zunächst sind nun die Acetonverbindungen der Glucose-schwefelsäuren untersucht worden, worüber demnächst berichtet werden wird; aber auch die in dieser Abhandlung angeschnittenen Fragen werden weiter bearbeitet.

Zur Konstitution des Vacciniins.

Von

Heinz Ohle.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Chemische Abteilung, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 17. Mai 1922.)

Als Vacciniin bezeichnete *Griebel*[1]) eine aus dem Safte der Preißelbeeren gewonnene Substanz, die er als eine benzoylierte Glucose betrachtete. Sie wurde von *E. Fischer* und *H. Noth*[2]) mit der durch Spaltung der Benzoyl-di-aceton-glucose dargestellten Monobenzoyl-glucose identifiziert; die Stellung der Benzoylgruppe blieb noch zweifelhaft. Nach dem neuesten Stande unseres Wissens über die Konstitution der Di-aceton-glucose[3]) könnte man versucht sein, ihr die Formel einer 3-Benzoyl-glucose zuzuschreiben. Indessen darf man die Möglichkeit einer Umesterung während der Aceton-abspaltung nicht aus den Augen verlieren.

Beim Studium der *Glucose-schwefelsäuren*[4]) machte ich nun einige Beobachtungen, die für die letztgeäußerte Anschauung sprechen. Die durch Abbau aus der Di-aceton-glucose-schwefelsäure erhaltene Mono-aceton-glucose-schwefelsäure war nicht identisch mit der durch Sulfonierung der Mono-aceton-glucose dargestellten. Diese Verschiedenheit kann kaum anders als durch eine ungleiche Stellung der SO_3H-Gruppe erklärt werden. Eine gegenseitige Umwandlung der beiden Substanzen ineinander war infolge der leichten Ablösung des Säure-restes nicht möglich.

Anders liegen die Verhältnisse bei den entsprechenden *Benzoylverbindungen.* Die Benzoylierung der Mono-aceton-glucose lieferte nämlich dieselbe Mono-benzoyl-mono-aceton-glucose, die *Fischer* und und *Noth* aus der Di-aceton-verbindung erhalten haben. Ist diese das primäre oder sekundäre Abbauprodukt? In Anbetracht der leichten Regenerierung des Di-aceton-glucose-derivates sollte man sich für die erste Auffassung entscheiden. Daraus würde folgen, daß bei der Benzoylierung der Mono-aceton-glucose der Benzoylrest an den Sauerstoff

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel **19**, 241. 1911.

[2]) Ber. **51**, 323. 1918.

[3]) *Karrer* und *Hurwitz*, Helv. chim. Acta **4**, 728. 1921.

[4]) Vgl. die demnächst in dieser Zeitschrift erscheinende Mitteilung V über Zucker-Schwefelsäuren.

in Stellung 3 tritt, ein Schluß, der sich schlecht mit der größeren Reaktionsfähigkeit der primären Alkoholgruppe vereinbaren läßt. Man könnte sich aber auch fragen, ob nicht bei der Einführung des Acetons unter dem Einflusse des Chlorwasserstoffs eine Acylwanderung stattfindet.

Daher habe ich versucht, die Salzsäure durch andere Katalysatoren zu ersetzen. Natriumacetat und Natriumsulfat versagten. Dagegen gelang es, mittels entwässerten Kupfersulfates Mono-aceton-glucose in guter Ausbeute in Di-aceton-glucose umzuwandeln. Diese Methode führte jedoch nicht zum Ziele, als ich sie auf die Mono-benzoyl-mono-aceton-glucose übertragen wollte. Dieser Fehlschlag ist wohl so zu deuten, daß die Benzoylgruppe in Stellung 6 sitzt und so den Eintritt des zweiten Aceton-komplexes vereitelt. Der neutrale Katalysator vermag also wohl zwei benachbarte freie Hydroxyle mit Aceton zur Reaktion zu bringen, nicht aber einen Platzwechsel des Acylrestes zu bewirken. Diese Fähigkeit bleibt auf die sauren Katalysatoren (Salzsäure und Schwefelsäure) beschränkt. Bei dem Abbau der Benzoyl-di-aceton-glucose durch verdünnte wässerige Säuren findet also nach oder während der Abspaltung des ersten Acetonmoleküls bereits die Umesterung statt, ohne daß es gelingt, das Zwischenprodukt, die 3-Benzoyl-mono-aceton-glucose, zu isolieren. Es soll versucht werden, durch Arbeiten in alkoholischer Lösung und durch Anwendung alkoholytisch schwach spaltbarer Salze, wie etwa Anilin-chlorhydrat, die erforderliche niedrige H-Ionenkonzentration zu erreichen, bei der die Acyl-wanderung so langsam verläuft, daß die noch unbekannte Zwischenstufe gefaßt werden kann.

Wenn also schon bei der Abspaltung des ersten Acetonkomplexes eine Acyl-wanderung an den Ort der größten Haftfestigkeit stattgefunden hat, so braucht man nicht mehr zu befürchten, daß bei dem darauffolgenden weiteren Abbau der Substituent den neu eingenommenen Platz nochmals verläßt, zumal diese zweite Prozedur mit den gleichen Mitteln ausgeführt wird wie die erste. Demnach wäre die Mono-benzoyl-glucose von *Fischer* und *Noth* und damit natürlich auch das Vacciniin *Griebels* als 6-Mono-benzoyl-glucose zu betrachten.

Das gleiche dürfte für die übrigen bisher in analoger Weise dargestellten Acyl-glucosen gelten, und manche damals überraschende Beobachtungen, z. B. die Verschiedenheit des α- und β-Di-benzoyl-di-aceton-erythrits[1]) und der beiden Mono-aceton-mono-benzoyl-dulcite[2]), begreiflich machen.

---

[1]) *Fischer* und *Rund*, Ber. **49**, 88. 1915.

[2]) *Fischer* und *Bergmann*, Ber. **49**, 289. 1916. Vgl. auch *Freudenberg* und *Ivers*, Ber. **55**, 929. 1922.

Darstellung der 6-Benzoyl-mono-aceton-glucose.

Die Benzoylierung erfolgte in der in der vorhergehenden Mitteilung[1]) bei der Sulfonierung der Glucose beschriebenen Apparatur. Zu einer Lösung von 11 g Mono-aceton-glucose in 50 ccm Pyridin läßt man ein Gemisch von 5,75 ccm Benzoylchlorid und 15 ccm Chloroform sehr langsam unter kräftigem Rühren, aber ohne Kühlung zutropfen. Dabei steigt die Temperatur auf ca. 45°. Das Reaktionsgut bleibt über Nacht bei Zimmertemperatur stehen und wird dann durch Destillation im Vakuum bei 50° vom Chloroform und Pyridin getrennt. Der sirupöse Rückstand scheidet beim Verrühren mit ca. 100 ccm Wasser die 6-Benzoyl-mono-aceton-glucose in weißen krystallinischen Flocken ab, die nach einmaligem Umkrystallisieren aus 95 proz. Alkohol völlig rein sind. Ausbeute 8,8 g = 55% der Theorie. Dieses Präparat schmolz bei 194—196° und hatte folgendes Drehungsvermögen: $= \frac{+0{,}04 \cdot 100}{0{,}502}$ $= +7{,}97°$. Diese Zahlen stimmen gut mit denen von *Fischer* und *Noth* überein. Auch in der Löslichkeit lassen sich keine Unterschiede zwischen beiden Substanzen erkennen.

Gewinnung von Diacetonglucose aus Monoacetonglucose mittels Kupfersulfat.

2 g Mono-aceton-glucose werden in 80 ccm trocknem Aceton gelöst und mit 2 g entwässertem Kupfersulfat 36 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Eine so lange Reaktionsdauer ist aber wahrscheinlich nicht unbedingt erforderlich. Man filtriert das Kupfersulfat ab, verjagt das Lösungsmittel auf dem Wasserbade und nimmt den Rückstand in 15 ccm Benzin auf. Beim Erkalten erscheinen die schönen langen Nadeln vom Schmelzpunkt 105°, die durch den Schmelzpunkt der Mischprobe mit Di-aceton-glucose als solche identifiziert wurde. Ausbeute 1,7 g = 71% der Theorie.

[1]) *Ohle*, diese Zeitschr. **131**, 601. 1922.

Autorenverzeichnis.

